

Das Effektorprotein SP7 und seine Rolle in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)



Genehmigt von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



Von Dipl.-Biol. Silke Kloppholz
aus Speyer

Karlsruhe, 14. September 2011

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent: Prof. Dr. Natalia Requena
Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick
Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Pflanze-Mikroben Interaktionen des Botanischen Instituts des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Zeit vom 11. Februar 2008 bis zum 14. September 2011 unter Anleitung von Prof. Dr. Natalia Requena angefertigt.

Referentin: Prof. Dr. Natalia Requena
Botanisches Institut
Abteilung für Pflanze-Mikroben Interaktionen

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick
Botanisches Institut
Molekulare Zellbiologie

Tag der Abgabe der Arbeit: 14. September 2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet habe.

Karlsruhe, 27.10.2011

Ort, Datum

Silke Kloppholz

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza -Symbiose	2
2.2 Signalaustausch während der AM-Symbiose.....	6
2.3 Das Immunsystem der Pflanzen.....	9
2.4 Zielsetzung	12
3 Material.....	13
3.1 Organismen.....	13
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	13
3.1.2 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	13
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
3.1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1.5 <i>Glomus intraradices</i>	14
3.1.6 <i>Aspergillus nidulans</i>	15
3.1.7 <i>Magnaporthe oryzae</i>	15
3.1.8 <i>Colletotrichum trifolii</i>	15
3.1.9 <i>Medicago truncatula</i>	15
3.1.10 <i>Daucus carota</i>	16
3.1.11 <i>Solanum tuberosum</i>	16
3.1.12 <i>Oryzae sativum</i>	16
3.2 Chemikalien.....	17
3.2.1 Organische Chemikalien	17
3.2.2 Enzyme	18
3.2.3 Kits	19
3.2.4 Geräte	19
3.2.5 Verbrauchsmaterial	20

3.2.6	Lösungen und Puffer	21
3.2.7	Kulturmedien	24
3.2.8	Plasmide	28
3.2.9	Primer	30
4	Methoden	32
4.1	<i>In vitro</i> Kultur Ri-transformierter mykorrhizierter <i>Daucus carota</i> Wurzeln.....	32
4.2	Anzucht pilzlichen Materials verschiedener Stadien der AM-Symbiose	33
4.2.1	Isolation und Oberflächensterilisation von Sporen von <i>G. intraradices</i>	33
4.2.2	Keimung und Induktion von <i>G. intraradices</i> Sporen.....	34
4.2.3	Isolation und Induktion extraradikaler Hyphen von <i>G. intraradices</i>	34
4.2.4	Keimung von <i>M. truncatula</i> und <i>O. sativa</i> Samen	36
4.2.5	Mykorrhizierung durch <i>Glomus intraradices</i>	36
4.2.6	Quantifizierung des Mykorrhizierungsgrades	36
4.2.7	Infektion von <i>M. truncatula</i> mit <i>Colletotrichum trifolii</i>	37
4.2.8	Behandlung von <i>M. truncatula</i> Wurzeln mit Pilzextrakten	37
4.2.9	Expression of SP7 in <i>Magnaporthe oryzae</i>	37
4.2.10	<i>In vivo</i> Sekretionstest von Effektorproteinen.....	37
4.2.11	Infektion von Reiswurzeln durch <i>M. oryzae</i>	37
4.2.12	Infektion mit Reisblättern durch <i>M. oryzae</i>	38
4.3	Transformationssysteme	38
4.3.1	Transformation von Bakterien.....	38
4.3.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
4.3.3	Transformation von <i>Aspergillus nidulans</i>	39
4.3.4	Erzeugung transgener <i>M. truncatula</i> Wurzeln.....	39
4.3.5	RNAi und Überexpression von MtERF19 in transgenen <i>M. truncatula</i> Wurzeln	39
4.3.6	Transformation von <i>N. benthamiana</i>	40
4.3.7	Protoplastentransformation von <i>Magnaporthe oryzae</i>	41
4.4	Molekularbiologische Methoden	41
4.4.1	Isolation genomischer DNA	41
4.4.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	42
4.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	43
4.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	43

Inhaltsverzeichnis

4.4.5	Isolation von DNA aus Agarosegelen	43
4.4.6	Restriktionsverdau von DNA.....	43
4.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 DNA Ligase	43
4.4.8	Klonierung von PCR Fragmenten in pCR2.1/TOPO	44
4.4.9	Direktionales Klonen von PCR Fragmenten in pENTRD-/TOPO.....	44
4.4.10	LR Rekombination zwischen Entry-Klon und Destination Vektor	44
4.4.11	Fällung von DNA	44
4.4.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	44
4.4.13	Colony-PCR zur Selektion von positiven Transformanten.....	45
4.4.14	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	45
4.4.15	Isolation der Gesamt-RNA aus Pilz- und Pflanzenmaterial	46
4.4.16	cDNA-Synthese.....	46
4.4.17	Real Time quantitative PCR	48
4.4.18	Southern Blot Analyse	49
4.5	Screen von cDNA Banken	49
4.5.1	Die Yeast-Signal-Sequence-Trap (YSST) Methode	49
4.5.2	Yeast-two Hybrid Analyse (Y2H)	51
4.5.3	Der X- α - Galactosidase -Test	51
4.5.4	3-AT Test	51
4.6	Mikroskopie	52
4.6.1	Tinte- Essig Färbung	52
4.7	<i>In silico</i> Analyse.....	52
5	Ergebnisse	54
5.1	Isolation sekretierter Proteine	54
5.1.1	Screen von cDNA-Banken mittels der Yeast Signal Sequence Trap (YSST) Methode	54
5.1.2	Eine neue Familie sekretierter Proteine in der AM.....	58
5.2	Charakterisierung des putativen Effektorproteins SP7	60
5.2.1	Entwicklungsstadien abhängiges Auftreten verschiedener SP7- Populationen	60
5.2.2	SP7 tritt in die Pflanzen Zelle ein und lokalisiert im Nukleus.....	65
5.2.3	Die konstitutive Expression von <i>SP7</i> fördert die Ausbildung der AM-Symbiose	69

5.2.4	SP7 interagiert mit dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor MtERF19 im Pflanzenzellkern.....	70
5.2.5	SP7 wirkt der MtERF19-induzierten Abwehrreaktion entgegen	76
5.2.6	MAMP-induzierte Expression von <i>MtERF19</i>	84
5.2.7	SP7 verlängert die biotrophe Phase der Wurzelinfektion des Reis-Pathogens <i>Magnaporthe oryzae</i>	88
6	Diskussion	94
6.1	Sekretierte Proteine in der AM.....	94
6.2	Die SP7-Proteinfamilie - Eine neuartige Familie potentieller Effektorproteine ...	96
6.3	SP7 - das erste Effektorprotein in der AM-Symbiose.....	98
6.4	Durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MtERF19 untergräbt SP7 die Abwehrreaktion der Pflanze.....	102
6.5	SP7 - ein universelles Effektorprotein.....	107
6.6	Fazit und Perspektive	109
7	Literaturverzeichnis	110
	Danksagung	121

Abkürzungsverzeichnis

Neben den SI-Einheiten und anderen allgemein bekannten Kürzeln wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMV	Blumenkohl Mosaik Virus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAPI	4'-9,6-diamidino-2-phenylindole
dest.	Destilliert
DMI	<i>Does Not Make Infections</i>
dNTPs	Desoxyribonucleotide
DsRED	Rot fluoreszierendes Protein der Koralle <i>Discosoma</i>
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
Enod11	<i>Early Nodulin 11</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Ethylen
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector triggered susceptibility</i>
FT	<i>Fluorescent timer</i>
GFP	Grün fluoreszierende Protein
GUS	Gen der β -Glucoronidase aus <i>E.coli</i>
HR	<i>Hypersensitive Response</i>
ISR	<i>Induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonsäure
LRRs	<i>leucin-rich-repeats</i>
LD	<i>Long Distance</i>
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>

Abkürzungsverzeichnis

MAP	<i>Mitogen -activated protein</i>
mRFP	Monomeres rot fluoreszierende Protein
M+S	M-Medium mit 10 g/l Saccharose
M-S	saccharosefreies M-Medium
<i>MtGEA</i>	<i>Medicago truncatula gene expression Atlas</i>
<i>MtPT</i>	<i>Medicago truncatula</i> Phosphat Transporter
NFR	Nod Faktor-Rezeptor Kinase
NHR	<i>nonhost resistance</i>
O.D.600	gemessene Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	Offenes Leseraster (<i>Open reading frame</i>)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPA	Präpenetrationsapparat
PTI	PAMP/MAMP <i>triggered immunity</i>
RLK	<i>Rezeptor-like-Kinase</i>
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
<i>suc2</i>	Invertase codierendes Gen in <i>S. cerevisiae</i>
SD/-LTHA	Synthetisches Dropoutmedium/-Leucin,-Tryptophan,-Histidin,-Adenin
SOC	Super Optimal Broth, Catabolite Repression
SP	Signalpeptid
SP7	Sekretiertes Protein 7
<i>StPT</i>	<i>Solanum tuberosum</i> Phosphat Transporter
SYMRK	<i>Symbiosis rezeptor-like kinase</i>
TC	<i>Tentative Consensus</i>
T _m	Schmelztemperatur
ÜN	Über Nacht
RNS	Wurzelknöllchen Symbiose
wt	Wildtyp
YSST	<i>Yeast Signal Sequence Trap</i>
(v/v)	Volumen-Volumen-Verhältnis
(w/v)	Gewicht-Volumen-Verhältnis

1 Zusammenfassung

Pflanzen interagieren mit einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen. Sie werden ständig von Pathogenen herausgefordert, bilden aber auch mutualistische Assoziationen mit nützlichen Mikroorganismen. Zwischen „Freund“ und „Feind“ zu unterscheiden ist daher von ungeheurer Bedeutung für die Pflanze.

Die mit Abstand am weitesten verbreitete nützliche Interaktion stellt die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose zwischen Pflanzenwurzeln und den Pilzen des monophyletischen Stamms der Glomeromycota dar. Die AM-Pilze unterstützen die Pflanzen mit essentiellen Nährstoffen wie anorganischem Stickstoff und Phosphat, verbessern das Pflanzen-Wachstum, fördern die pflanzliche Vielfalt und spielen eine wichtige Rolle im Nährstoffkreislauf unseres Planeten. Die AM-Symbiose ist daher von globaler Bedeutung. Obligat biotrophe Pilze, wie die AM-Pilze, etablieren Langzeitbeziehungen mit ihren Wirten um ihren Lebenszyklus vervollständigen zu können. Dabei müssen sie mit den Abwehrreaktionen dieser zurechtkommen um sich in der lebenden Pflanze entwickeln zu können. Es ist allgemein anerkannt, dass pathogene Mikroorganismen über eine Vielzahl sekretierter Effektorproteine verfügen um das zelluläre Programm ihres Wirtes zu manipulieren und einer Abwehrreaktion zu entgehen. Über potentielle Effektorproteine in der AM war allerdings bisher nichts bekannt.

Durch Modifizierung der *Yeast Signal Sequence Trap* Methode gelang es in dieser Arbeit eine neuartige Familie sekretierter Proteine des AM-Pilzes *Glomus intraradices* zu isolieren. Alle Mitglieder dieser kleinen Familie zeigen einen konservierten Domänenaufbau mit Signalpeptid, Zellkern Lokalisationssignal und hydrophilen, tandem-artigen Repeats. Es konnte gezeigt werden, dass ein Protein dieser Familie, SP7, von *G. intraradices* sekretiert wird und nach Translokation in die Pflanzenzelle im Zellkern mit dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor MtERF19 interagiert. Die Expression von *MtERF19* wird stark durch eine pathogene Interaktion mit *Colletotrichum trifolii*, sowie von verschiedenen pilzlichen Zellextrakten aber nur transient während der Kolonisierung durch Mykorrhizapilze induziert. Konstitutive Expression von SP7 in Pflanzen führte zu einem höheren Mykorrhizierungslevel, reduzierte aber die durch *C. trifolii* hervorgerufene Induktion von *MtERF19* sowie des pflanzlichen Abwehrgens *PR10b*. Desweiteren verminderte die Expression von SP7 im Reispathogen *Magnaporthe oryzae* die pathogenen Symptome der Wurzelinfektion. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es sich bei SP7 um ein Effektorprotein handelt, welches durch Unterdrückung der pflanzlichen Immunantwort zur Etablierung des biotrophen Status beiträgt. SP7 ist somit das erste für die AM-Symbiose beschriebene Effektorprotein und belegt, dass auch die mutualistisch symbiotischen AM-Pilze auf den gleichen Mechanismus zurückgreifen, den Pathogene nutzen um ihre Wirte zu manipulieren. Diese neuen Erkenntnisse tragen bei zu einem besseren Verständnis und der Kontrolle von pathogenen Interaktionen und könnten den Einsatz von AM-Pilzen in der nachhaltigen Landwirtschaft vorantreiben.

2 Einleitung

2.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose

Von Anfang an war die Erfolgsgeschichte der Pflanzen eng verknüpft mit der Ausbildung von Lebensgemeinschaften mit anderen Organismen. Die Begründung des Reiches selbst resultierte wahrscheinlich aus der endosymbiotischen Aufnahme einer heterotrophen eukaryotischen Zelle, aus der sich die Chloroplasten entwickelten (Kutschera und Niklas, 2005).

Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose (AM-Symbiose) ist ein herausragendes Beispiel für eine solch erfolgreiche Partnerschaft. Über 200.000 Arten der heutigen Landpflanzen mitunter Pteridophyten, Bryophyten, Gymnospermen und 80 % aller Angiospermen leben in dieser mutualistischen Lebensgemeinschaft mit Pilzen des neuen, monophyletischen Stamms der Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). Wie unsere Erde heute aussähe, hätte sich die AM-Symbiose niemals ausgebildet, lässt sich natürlich unmöglich beantworten. Doch es gibt zahlreiche Hinweise für eine Koevolution der ersten Landpflanzen und der Pilze der Ordnung Glomales, deren Interaktion von großer Bedeutung für die Eroberung des Landes durch die Pflanzen im später Ordovizium gewesen sein könnte (Pirozynski und Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993). Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Landmassen von eukaryotischen Organismen nahezu unbesiedelt. Einzig Grünalgen und Flechten war es bisher gelungen diesen Lebensraum zu besiedeln, der sich im Gegensatz zum Meer durch eine weitaus schlechtere Verfügbarkeit der Nährstoffe sowie die ständige Gefahr der Austrocknung auszeichnete. Die Ausbildung der AM-Symbiose könnte daher der entscheidende Schritt gewesen sein um den Pflanzen den Landgang zu ermöglichen, denn auch heute noch hilft das weitläufige Hyphenetz der Pilzpartner den Pflanzen das Einzugsgebiet ihres Wurzelsystems deutlich zu vergrößern. Hierdurch wird es ihnen ermöglicht an Nährstoffe wie Phosphat, Stickstoff, Zink oder Kupfer zu gelangen, die nur spärlich oder schwer zugänglich im Boden vorliegen (Ezawa *et al.*, 2005, Jin *et al.*, 2005). Zudem konnte erwiesen werden, dass mykorrhizierte Pflanzen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Austrocknung (Safir *et al.*, 1971; Davies *et al.* 1993) und eine verbesserte Resistenz gegenüber Pathogenen aufweisen (Dehne und Schoenbeck, 1997, Cordier *et al.* 1998). Letzteres ist vermutlich zum einen auf den besseren Ernährungszustand der in Symbiose lebenden Pflanzen zurückzuführen zum anderen auf ein *Priming* der Abwehrreaktion der Pflanzen, hervorgerufen durch die AM-Pilze (Colditz *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Das Hyphengeflecht des Pilzes schützt des Weiteren das die Pflanzen umgebende Substrat vor Erosion und zusätzlich bindet das von AM-Pilzen sekretierte Protein Glomalin Schwermetalle und macht sie dadurch unschädlich (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004). Auch für den Pilz bietet diese mutualistische Lebensgemeinschaft große Vorteile, so versorgt die Pflanze ihren Partner mit bis zu 20% ihres photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs (Jakobsen und Rosendahl, 1990) und bietet ihm Lebensraum sowie Schutz vor anderen Bodenorganismen.

Gestützt wird die Theorie der Koevolution durch die Entdeckung 400 Millionen Jahre alter kolonisierter Wurzeln (Remy *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 1882) und das zeitgeschichtlich frühe Auftreten der Glomales, welches durch Funde fossiler Sporen und Hyphen, datiert auf ein Alter von 460 Millionen Jahren, nachgewiesen werden konnte (Redecker *et al.*, 2000). Nur wenige Pflanzen sind nicht in der Lage die AM auszubilden. Dazu zählen Vertreter der Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Cruziferaceae und Uricacea (Smith und Read, 1997; Vierheilig *et al.*, 1996). Diese Arten sind evolutionär jünger und erst zu einem Zeitpunkt vor ca.100 Millionen Jahren entstanden, was als weiteres Indiz für die Theorie der Beteiligung der AM-Pilze an der Landbesiedelung angesehen werden kann. Im Einvernehmen mit ihrer evolutionären Geschichte kann die AM-Symbiose heute in fast allen Ökosystemen gefunden werden. Ihr Auftreten wurde sogar in Wüsten (Corkidi und Rincön, 1997; Dalpé *et al.*, 2000) und stark salzhaltigen Ökosystemen (Carvalho *et al.*, 2001) beschrieben. In den gemäßigten Breiten tritt die AM bei krautigen Pflanzen auf, wohin gegen unsere heimischen Waldbäume zum größten Teil mit Ektomykorrhizapilzen eine ektotrophe Mykorrhizasymbiose eingehen. Zu den Ektomykorrhizapilzen, die fast ausschließlich der Gruppe der Basidiomyceten angehören zählen auch zahlreiche Speisepilze. Sie umspannen die Wurzeln mit einem engmaschigen Geflecht (Hartigisches Netz), das bis in den Interzellularraum der Wurzelzellen vordringen kann. Mykorrhizierte Wurzelbereiche spezialisieren sich auf den Nährstoffaustausch mit dem Pilz und stellen das Längenwachstum ein. Im Gegensatz dazu endet die endosymbiotische AM nicht bei der Besiedelung der Interzellularräume der Pflanzen. Sie gipfelt in der Ausbildung bäumchenartiger Strukturen den so genannten Arbuskeln, in den Kortezellen der Wirtspflanzen, die namensgebend für die gesamte Symbiose wirkten. Als obligat biotrophe Pilze, die auf einen lebenden pflanzlichen Wirt angewiesen sind um ihren Lebenszyklus zu vervollständigen, weisen die AM-Pilze keine Wirtsspezifität auf. Die 5000 bis 6000 Vertreter der Ektomykorrhizapilze hingegen sind in der Lage sich auch saprotroph zu ernähren und können sich daher eine gewisse Wirtsspezifität erlauben.

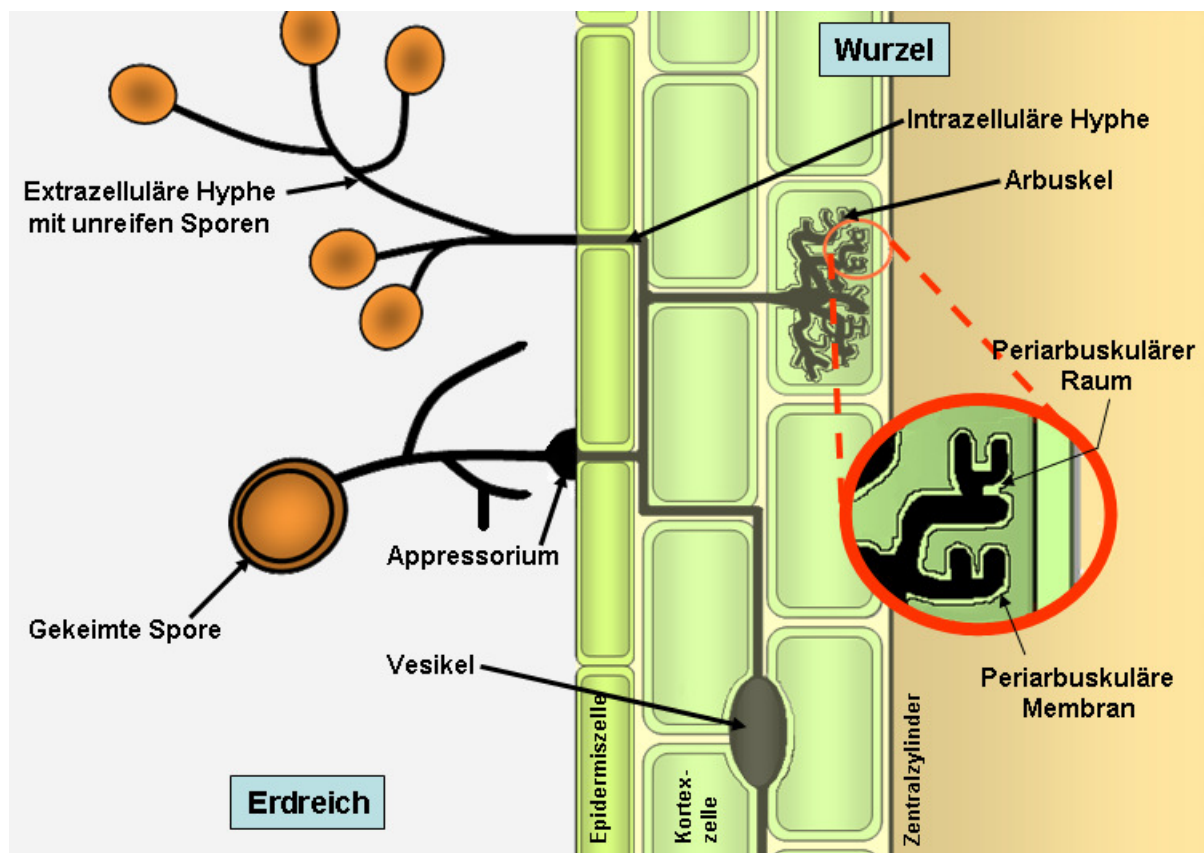
Der Lebenszyklus der AM-Pilze ist untrennbar mit der Kolonisierung der Wurzeln ihres Pflanzenwirtes verknüpft (Abb. 2.1). Einzig die Keimung ihrer asexuell gebildeten Sporen im Erdreich kann unabhängig von einem Pflanzenpartner erfolgen. Diese so genannte präsymbiotische Wachstumsphase des Pilzes wird allerdings begrenzt durch die Menge der in den Sporen in Form von Triacylglyceriden und Glykogen gespeicherten Vorratsstoffe. Nach einer mehrwöchigen Phase der Dormanz keimt die vielkernige Spore (1000-3850 Zellkerne). Dieser Prozess ist sowohl von abiotischen Faktoren wie Feuchtigkeit, pH-Wert und Temperatur des Substrates (Green *et al.*, 1976) als auch von biotischen Faktoren wie wachstumsfördernden Pflanzenexudaten (Bécard und Piché, 1989; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Nair *et al.*, 1991), abhängig. Die sich aus der Spore entwickelnden Hyphen durchforsten den Boden in allen Richtungen auf der Suche nach einem geeigneten Pflanzenwirt. Das Hyphenwachstum endet nach bis zu 4 Wochen falls der Pilz keine geeignete Wirtspflanze findet. In diesem Fall zieht der Pilz das Zytoplasma zurück in die Spore und trennt die leeren Hyphen durch Septen ab. Die Spore begibt sich in eine erneute Ruhephase, bereit unter den richtigen Bedingungen wieder zu keimen. Diesen Prozess kann sie bis zu zehnmal durchlaufen (Koske, 1981) und so ihre Chance, vor Erschöpfung der letzten Reserven, eine geeignete

2 Einleitung

Wurzel zu finden massiv verbessern. In räumlicher Nähe einer Wirtswurzel beginnen die Hyphen sich stark zu verzweigen. Auch hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit vergrößert im Verlaufe des ungerichteten Wachstumsprozesses auf eine nahe Wurzel zu treffen (Buée *et al.*, 2000; Giovannetti *et al.*, 1993). Ausgelöst wird dieses Verhalten durch die Perzeption eines pflanzlichen *Branching Factors*, der als Strigolacton 5-Deoxystrigol identifiziert wurde (Akiyama *et al.*, 2005).

Die symbiotische Wachstumsphase des Pilzes wird mit der physischen Kontaktaufnahme von Pilz und Wurzel und der Ausbildung von Appressorien (auch als Hyphopodien bezeichnet) eingeleitet. Dabei handelt es sich um die geschwollenen Spitzen der Hyphen, die dem Eindringen in den Wirt dienen. Mit Hilfe dieser spezialisierten Organe können die Pilze die Wurzeloberfläche entweder direkt durch die Epidermiszellen hindurch oder entlang des Apoplasten zwischen zwei Epidermiszellen (Demchenko *et al.*, 2004), durchdringen. Die Rolle der Pflanze während des Infektionsprozesses konnte von Genre *et al.* (2005,2008) in ein völlig neues Licht gesetzt werden. In zwei Veröffentlichungen zeigten die Forscher, dass sich die Pflanzenzelle aktiv auf die Infektion mit dem AM-Pilz vorbereitet. Dies erfolgt 4 bis 5 Stunden nach der Bildung der Appressorien durch die Ausbildung des Präpenetrationsapparates (PAA) einer Art zytoplasmatischer Brücke, die den Weg der Hyphe durch die Zelle determiniert. Begleitet wird das Entstehen des PAA von der Migration des Zellkerns. Dieser wandert zunächst zur antizipierten Eintrittsstelle des Pilzes und leitet dann die Hyphen durch die Zelle in den Kortextbereich. Dort verlässt der Pilz die Pflanzenzelle, tritt in den Apoplasten ein und besiedelt über den interzellulären Raum den Kortextbereich der Pflanzen mit einem intraradikalen Hyphennetz. Das Apikalmeristem sowie die Wurzelhaube bleiben allerdings von der Besiedelung ausgeschlossen. Die Hyphen durchbrechen die Zellwände der inneren Wurzelkortextzellen und bilden durch mehrmaliges dichotomes Verzweigen die für die Symbiose namensgebenden Arbuskeln. Dabei durchdringen die Hyphen allerdings nie die Plasmamembran der Pflanzenzelle, sondern schaffen durch die Invagination derselben den Periarbuskulären Raum als ein neues apoplastisches Kompartiment. Begrenzt wird dieser durch die pilzliche Membran sowie die extrem oberflächenvergrößerte Plasmamembran der Pflanzen (Periarbuskuläre Membran). Durch die Anlagerung pilzlicher und pflanzlicher Stoffe an den Apoplasten zwischen diesen Membranen, wird eine neue flexible Grenzstruktur gebildet, die sowohl dem Stoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern, als auch der Abgrenzung dieser voneinander dient (Bonfante und Perotto, 1995, Perotto *et al.*, 1995). Sowohl vom Pilz als auch von der Pflanze wird hier die Expression spezifischer Transportproteine induziert, die den bidirektionalen Austausch von Nährstoffen über den Periarbuskulären Raum steuern. Auf Seiten der Pflanzen wurden verschiedene Phosphattransporter identifiziert die mykorrhiza-spezifisch exprimiert werden. So können der Phosphattransporter 3 von *Solanum tuberosum* (StPT3) (Rausch *et al.*, 2001) sowie der Phosphattransporter 4 von *Medicago truncatula* (MtPT4) (Harrison *et al.*, 2002, Javot *et al.* 2007) nur in von AM-Pilzen besiedelten Zellen nachgewiesen werden und daher als Marker zur Überprüfung des Mykorrhizierungslevels genutzt werden. (Karandashov *et al.*, 2004). Die für die Transportprozesse notwendige Energiemenge wird durch die Aktivität pilzlicher und pflanzlicher H⁺-ATPasen bereitgestellt, die in der Ausbildung eines elektrochemischen Gradienten resultiert (Gianinazzi-Person *et*

al., 1990; Gianinazzi-Person *et al.*, 2000, Ferrol *et al.*, 2002, Krajinski *et al.*, 2002; Requena *et al.*, 2003).



2.1 Der Lebenszyklus eines arbuskulären Mykorrhizapilzes (*Glomus intraradices*)

Die reifen Sporen des Pilzes keimen nach mehrwöchiger Dormanz und durchforsten mit ihren Hyphen, die sich bei Perzeption eines pflanzlichen *Branching Factors* weiter verzweigen, das Erdreich. Bei physischem Kontakt mit einer Pflanzenwurzel bildet der Pilz ein Appressorium auf der Wurzeloberfläche, dringt mit seinen Hyphen in den Apoplasten der Wurzel ein und bildet dort ein interzelluläres Myzel aus. In Zellen des inneren Kortex der Wurzel entstehen die Arbuskeln als Organe des Nährstoffaustausches, sowie Vesikel als Speicher von Nährstoffreserven. Durch die Invagination der pflanzlichen Plasmamembran durch den Pilz entsteht der Periarbuskuläre Raum, dessen umgebende Membranen eine wichtige Rolle während der Stoffaustauschprozesse einnehmen. Mit dem Verlassen der Wurzel und der Bildung eines extraradikalen Myzels endet der Lebenszyklus. Diese Hyphen dienen der Nährstoffaufnahme aus dem Boden und bilden die neuen Sporen, die nach ihrer Keimung einen neuen Zyklus durchlaufen können.

Begleitet ist die Ausbildung der Arbuskeln von umfassenden morphologischen Umgestaltungen der Zelle wie Fragmentierung der Zentralvakuole, Migration des Nukleus in das Innere der Zelle, Rearrangement des Zytoskeletts und dem Aufbau eines die Arbuskel umspannenden Plastidennetzwerkes. (Bonfante und Perotto, 1995; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Genre und Bonfante, 1997; Genre und Bonfante, 1998, Harrison, 1999; Blanceflor *et al.*, 2001; Lohse *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2008). Erstaunlicherweise kollabieren die Arbuskeln bereits nach wenigen Tagen wieder und hinterlassen intakte, für eine erneute Kolonisierung zugängliche Kortexzellen (Dickson und Smith, 2001). Einige der AM-Pilze bilden als weitere intraradikale Strukturen lipidreiche Vesikel aus, die für die Bildung und den Transport von Speichersubstanzen von Bedeutung sind (Cooper und Lösel, 1978, Nemeč, 1981). Während die Mykorrhizierung der Wurzelzellen durch das intraradikale Hyphensystem noch fortschrei-

2 Einleitung

tet, entstehen neue Hyphen außerhalb der Wirtspflanze die ein weitläufiges extraradikales Myzel (ERM) bilden. Dieses beinhaltet sowohl lange einzelne Pilzfäden, *runner hyphae*, die zur Besiedelung neuer Wurzeln das Substrat durchziehen, als auch dichotom verzweigte Hyphen (*branched absorbing structures*), die das Erdreich fächerartig durchspannen und der Absorption von Nährstoffen dienen (Friese und Allen, 1991; Bago *et al.*, 1998). Für die Aufnahme von Nährstoffen durch das ERM bedarf es ebenfalls einer Vielzahl spezifischer Transportproteine. Bisher konnten aber nur weniger dieser Transporter identifiziert werden. Darunter ein Ammoniumtransporter (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006), ein Aminosäure Transporter (Cappellazzo *et al.*) und ein Zinktransporter (González-Guerrero *et al.*, 2005). Zudem konnten in verschiedenen AM-Pilzen Homologe eines Transporters mit hoher Affinität zu Phosphat entdeckt werden (Harrison und van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005). Das extraradikale Myzel stellt weiterhin einen Speicher für von der Pflanze ins Hyphennetzwerk eingespeiste Nährstoffe dar und ist somit eine wichtige Komponente im Nährstoffkreislauf der Mikroorganismen des Bodens (Dodd, 1994). Auch die Bildung der neuen Sporen, mit deren Entstehung sich der Lebenskreislauf eines AM-Pilzes schließt, nimmt im extraradikalen Myzel ihren Ursprung. Da die Sporen durch ihre reichhaltigen Kohlenstoffvorräte eine attraktive Nährstoffquelle für bodenbewohnende Organismen sind, weisen sie eine dicke, widerstandsfähige Hülle auf, durch die sie während der Wachstumsruhephasen geschützt sind.

2.2 Signalaustausch während der AM-Symbiose

Obwohl die Pilzhyphen der AM-Pilze nicht nur in die interzellulären Zwischenräume der pflanzlichen Symbiosepartner vordringen, sondern sogar bis in das intrazelluläre Milieu, wird keine massive Abwehrreaktion von Seiten der Pflanze ausgelöst (García-Garrido und Ocampo, 2002). Dieser Prozess, sowie andere Vorgänge, die zur Etablierung der AM führen setzen eine Kommunikation der Symbiosepartner voraus. Einige dieser Signale wurden bereits identifiziert, wie der von der Wirtspflanze sezernierte *Branching Factor*, der schon vor dem ersten physischen Kontakt eine Reaktion im Pilzpartner hervorruft. Weiterhin wurden bereits Komponenten eines Signalwegs entdeckt, die sowohl bei der Etablierung der AM eine Rolle spielen, als auch bei der gut untersuchten Interaktion zwischen Leguminosen und Rhizobien.

Im Gegensatz zu der AM ist die Endosymbiose mit stickstoff-fixierenden Bakterien auf wenige Pflanzenfamilien beschränkt. In den Bakterien enthaltenden Wurzelknöllchen findet die Fixierung von Stickstoff statt, der der Pflanze in Form von Ammonium im Austausch mit Kohlenstoff bereitgestellt wird. Flavonoide der Leguminosen lösen im Bakterium die Genexpression und Synthese eines zweiten Signals aus. Dieser so genannte Nod Faktor besteht aus modifizierten Oligomeren des Chitins und führt in der Wirtspflanze zu einer Krümmung der Wurzelhaare, wodurch eine Rhizobienkolonie eingeschlossen werden kann und die Infektion einleitet (Dénarié *et al.*, 1996). Kosuta *et al.* (2003) konnten nachweisen, dass auch durch diffusible Signale eines AM-Pilzes das frühe Nodulin-Gen *MtEnod11* induziert werden kann, bevor physischer Kontakt zwischen Wurzel und Pilz hergestellt ist. Einige der für beide Symbiosen essentiellen Signalwegskomponenten sind die so genannten SYM-Gene, von denen

besonders die Gene *dmi1*, *dmi2* und *dmi3* (*does not make infection*) von zentraler Bedeutung zu sein scheinen. Die Identifikation dieser Gene erfolgte an Mutanten die in der Ausbildung beider Symbiosen gestört waren. Nach heutigen Kenntnissen lässt sich hieraus auf folgenden gemeinsamen Signaltransduktionsweg zur Einleitung der Symbiosen schließen:

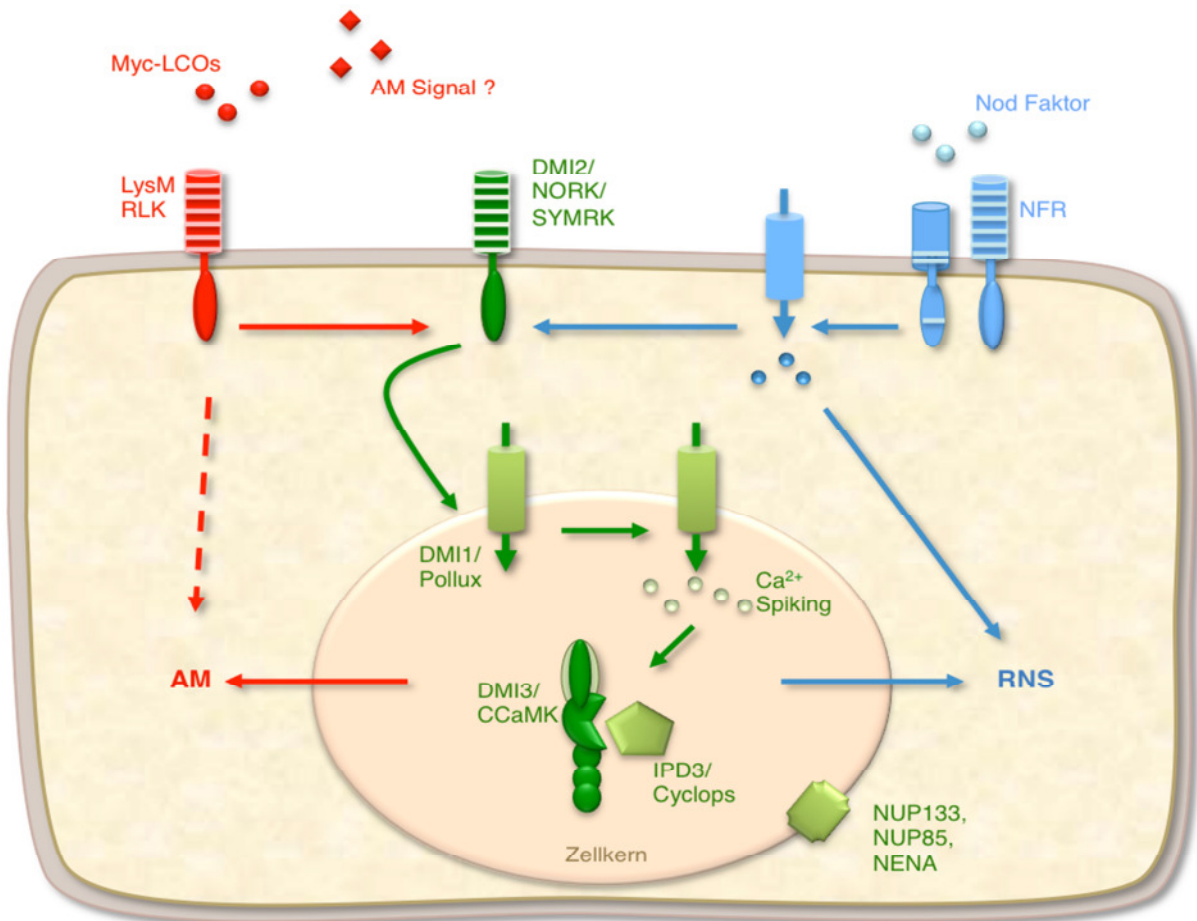
Die nach bisherigem Kenntnisstand erste Schnittstelle des Signalweges (Abb. 2.2) stellt die transmembrane LRR-Rezeptor Kinase DMI2 (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002) dar. Dieser vorgeschaltet liegen zur Ausbildung der Wurzelknöllchen Symbiose (RNS) die Nod-Faktor-Rezeptor-Kinasen (NFR1 und NFR5 in *L. japonicus*; LYK3 in *M. truncatula*), die die Signale der Rhizobien perzipieren (Radutoiu *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003). Ein spezifischer Rezeptor für Signalmoleküle der AM-Pilze wurde bisher hingegen noch nicht eindeutig identifiziert. Tatsächlich konnte jedoch erst kürzlich in der nicht Leguminosen, jedoch knöllchen-bildenden Pflanze *Paspalonia andersonii* ein LysM (Lysin Motiv)-enthaltender Rezeptor beschrieben werden, der sowohl für die RNS, als auch die AM notwendig ist (Op den Camp *et al.*, 2011). Da dies der einzige LysM Rezeptor dieser Pflanze ist und diese Gruppe von Rezeptoren an der Perzeption von Chitinderivaten beteiligt ist, ist anzunehmen, dass auch AM-Pilze Substanzen sezernieren die auf Chitin als Rückgrat beruhen. Tatsächlich ist es Maillat und Kollegen (2011) vor kurzem gelungen eine Gruppe pilzlicher Botenstoffe chemisch zu charakterisieren. Auf der Suche nach bioaktiven Lipochitooligosacchariden (LCOs) identifizierten sie von AM-Pilzen produzierte Substanzen (Myc-LCOs), die den Nod Faktoren von Rhizobien sehr ähneln und typische Antworten in Wirtswurzeln induzieren.

DMI2 und seine Orthologe (LjSYMRK *L. japonicus*) kodieren für Leucin-reiche Wiederholungen enthaltende RezeptorKinasen (*leucin-rich repeats receptor-like kinases*, LRR-RLK). Das SYM Gen enthält in seiner extrazellulären Domäne drei Leucin-reiche Wiederholungen, die häufig an Interaktionen mit anderen Molekülen beteiligt sind. Dennoch konnte bisher für DMI2 keine Bindung eines Liganden nachgewiesen werden. DMI1 kodiert für ein Protein, das Ähnlichkeit zu bakteriellen Ligand-abhängigen Ionenkanälen zeigt und in der Kernmembran lokalisiert ist (Ané *et al.*, 2004). Das dritte SYM-Gen *dmi3* codiert für eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Lévy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004), die im Zellkern lokalisiert ist (Smit *et al.*, 2005). Sowohl während der RNS als auch während der AM konnten Calcium-Antworten als Reaktion auf diffusible Signalstoffe beobachtet werden (Navazio *et al.*, 2007). Bei diesem so genannten Calcium-*Spiking* kommt es zu schnellen Fluktuationen der intrazellulären Calciumkonzentration (Ehrhardt *et al.*, 1996; Shaw und Long, 2003).

Da das Calcium-*Spiking* in *dmi1* und *dmi2* nicht aber in *dmi3* Mutanten beeinflusst ist, gelten die ersten beiden Gene als *dmi3* übergeordnet. Das bisher entwickelte Modell sieht vor, dass DMI2 entweder durch Phosphorylierung, oder über bisher nicht identifizierte Komponenten, DMI1 am Kern aktiviert, woraufhin dieses das Calcium-*Spiking* auslöst. Neben DMI1 und DMI2 sind die Kernporen-assoziierten Proteine NUP133, NUP85 und NENA an der Erzeugung des Calcium-Signals beteiligt (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007; Groth *et al.*, 2010). Worin genau hier ihre Funktion liegt ist jedoch noch unbekannt. Durch Interpretation des Musters der Calcium-Fluktuation induziert DMI3 in Kooperation mit dem interagierenden Protein IPD3 (*interacting protein of DMI3*) die Expression der entsprechenden Gene (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur RNS (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*,

2 Einleitung

2005; Middleton *et al.* 2007), konnten für die AM bisher keine spezifischen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Gene, die DMI3 abhängig reguliert werden, sind hingegen bekannt (Weidmann *et al.*, 2004; Siciliano *et al.*, 2007). So fanden Siciliano *et al.* (2007) unter anderem ein Gen, involviert in eine pflanzliche Abwehr Reaktion, das durch DMI3 reprimiert wird und somit die zentrale Rolle dieses SYM-Gens in der Signaltransduktionskaskade zu unterstreichen scheint.



2.2 DMI-Signaltransduktionskaskade

(Modell des gemeinsamen Signalweges zur Perzeption diffusibler Signalstoffe von Rhizobien und AM-Pilzen) Durch Nod-Faktor-Rezeptor Kinasen (NFR) werden die Signale der Rhizobien erkannt und eine spezifische Antwort in der Pflanze ausgelöst. Die durch die NFR ausgelöste Depolarisierung der Membran führt zur Krümmung der Wurzelhaare und trägt somit direkt zur Nodulation bei. Hinweise für Rezeptoren pilzlicher Signale (Myc-LCSs) wurden erst kürzlich gefunden. Die Signalweiterleitung durch DMI2 erfolgt eventuell durch Phosphorylierung oder über weitere Komponenten zur Aktivierung des Calcium-Kanals DMI1. Die von DMI1 ausgelöste Calcium-Antwort ist außerdem von Nuklepor-Proteinen NUP133, NUP85 und NENA abhängig und wird von DMI3 und dem assoziierten Protein IPD3 interpretiert. Diese Calcium/Calmodulin abhängige Kinase reguliert dementsprechend die Transkription der für die Symbiose wichtigen Gene. Rote Komponenten sind spezifisch für die AM, blaue Komponenten sind RNS spezifisch und grüne sind Teil des AM und RNS gemeinsamen Signalweges.

2.3 Das Immunsystem der Pflanzen

Pflanzen sind sessile Organismen. Im Gegensatz zu Tieren besitzen sie auch keine mobilen Abwehrzellen oder ein somatisches adaptives Immunsystem. Dennoch müssen auch sie, um ihr Überleben zu sichern, in der Lage sein Gefahren zu erkennen, diese zu bewerten und entsprechend zu reagieren. Zu diesem Zweck haben Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, die dazu beitragen die durch pathogene Mikroorganismen verursachten Schäden einzudämmen. Im Allgemeinen lassen sie hierbei die konstitutiven, präformierten von den induzierten, aktivierten Reaktionen unterscheiden. Die präformierten Abwehrmechanismen beinhalten physikalische oder strukturelle Barrieren sowie biochemische Reaktionen, die das Anhaften, das Eindringen und die Ausbreitung der Pathogene im Wirt limitieren sollen (Buchanan *et al.*, 2000; Agrios, 2005). Dabei spielt die Zellwand der Pflanzen eine herausragende Rolle (Hückelhoven, 2007).

Dennoch gelingt es immer wieder einigen Mikroorganismen diese präinvasiven Hürden zu überwinden und in die Pflanzen einzudringen. In diesem Fall gewinnen die induzierten Abwehrreaktionen an Bedeutung da durch die Perzeption der Eindringlinge eine effektive Immunantwort initiiert wird (Abb. 2.3) (Jones und Dangl, 2001, Chrischold *et al.*, 2006). Dieses angeborene Immunsystem zweigt sich wiederum in zwei Arme auf. Der erste Arm der Abwehr erkennt und reagiert auf Moleküle, die strukturell konserviert in vielen Klassen von Mikroben, auch nicht pathogenen, vorzufinden sind. Diese sogenannten PAMPs oder MAMPs (*pathogen/microbe associated molecular pattern*) werden von transmembranen Rezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) erkannt wodurch eine effektive Abwehr eingeleitet wird (Meyers *et al.*, 2003; Nürnberger, *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004). Das bestuntersuchte MAMP ist sicherlich das bakterielle Flagellin. Andere Beispiele wären Lipopolysaccharide, der bakterielle Elongationsfaktor-TU, Kälteschockproteine und Chitin (Kamoun *et al.*, 1997; Nürnberger *et al.*, 2004; Chrischold *et al.*, 2006). Zusätzlich zu diesen Molekülen ist es Pflanzen auch möglich eigene Schadprodukte zu perzipieren. Solche DAMPs (*damage associated molecular pattern*) entstehen durch das gewaltsame Eindringen einiger Pathogene, beispielsweise bei der hydrolytischen Spaltung der Zellwand (Mackey und McFall, 2006). Die Perzeption der MAMPs führt zu einer typischen Reaktion der Zelle, die neben der schnellen Alkalisierung des Mediums auch zur Produktion von Nitrid Oxiden (NO) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt, welche die Vermehrung des Eindringlings eingrenzen sollen. Die Signaltransduktion erfolgt über eine MAP Kinasen Kaskade die z.B. in der Aktivierung der Synthese antimikrobieller Peptide und der Akkumulation von *pathogenesis related* (PR)-Proteinen resultieren kann (Asai *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; Torres und Dangl, 2005, Bittel und Robatzek, 2007). Die Gesamtheit der Reaktionen die durch die Erkennung der mikrobiellen PAMPs/MAMPs ausgelöst wird, wird als PTI (*PAMP triggered immunity*) bezeichnet.

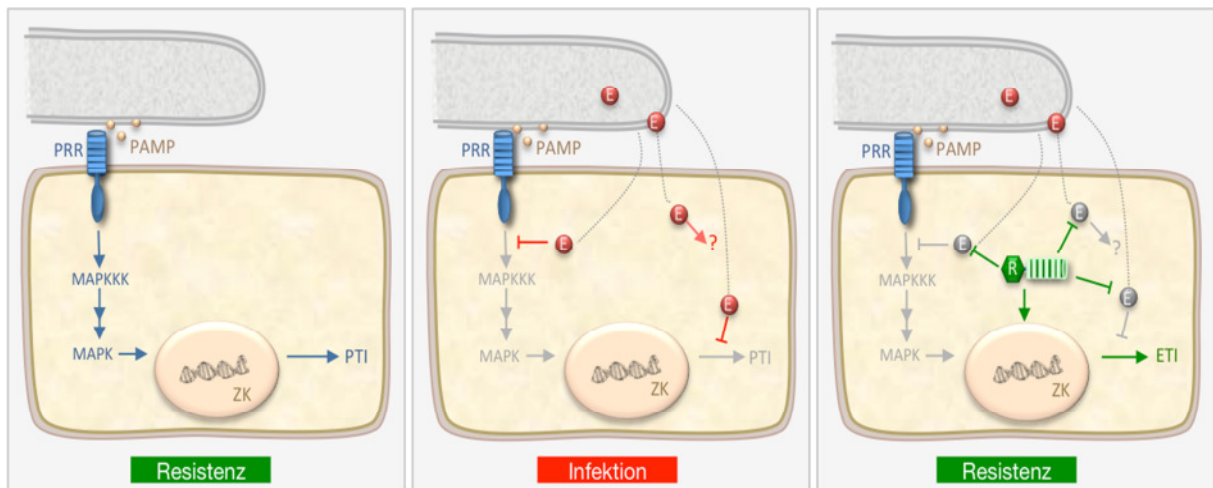
Im Verlauf der langen Koevolution zwischen Pathogenen und ihren Wirten haben zahlreiche Mikroorganismen die Fähigkeit erworben die durch MAMPs induzierte erste Abwehrlinie zu überwinden. Zu diesem Zweck sekretieren sowohl bakterielle als auch pilzliche Pathogene und Oomyzeten Effektorproteine, die es ihnen erlauben das zelluläre Programm ihrer Wirte

2 Einleitung

zu manipulieren und so eine Infektion zu ermöglichen (zusammengefasst von Stergopoulos und de Witt). Für viele der Effektoren konnte gezeigt werden, dass sie nach Translokation in die pflanzlichen Zellen, direkt mit den Signalvorgängen der PTI oder nachgeschalteten Prozessen interferieren (Chrisohm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Andere Effektorproteine erfüllen strukturelle Funktionen, z.B. in der extrahaustoriellen Matrix, die während der Infektion von Pilzen und Oomyzeten gebildet wird (Schultze-Lefert und Panstruga, 2003) oder sie fördern die Abzweigung von Nährstoffen des Wirtes sowie die Ausbreitung des Pathogens im Wirt (Badel *et al.*, 2002). Die Aktivität der jeweiligen Effektoren resultiert in der sogenannten *effector triggered susceptibility* (ETS) der Wirtsorganismen (Kamoun, 2006; Hogenhout *et al.*, 2009).

Der Zweite Arm der angeborenen Pflanzenabwehr, reagiert auf diese spezifischen Virulenzfaktoren der eindringenden Mikroorganismen. Durch R-Proteine (Resistenz-Proteine) der Pflanzen wird dann die *effector triggered immune response* (ETI) eingeleitet (Chrisohm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Bei den meisten R-Proteinen handelt es sich um polymorphe NB-LRR Proteine, die nach ihren charakteristischen Nucleotid-binde (NB) und Leucin reichen Repeat (LRR)-Domänen benannt sind (Dangl und Jones, 2001). Die R-Proteine erkennen die Effektoren direkt (Rezeptor-Liganden Model) oder das aus der Wirkung dieser Moleküle resultierende, veränderte Selbst der Pflanze (*guard hypothesis*) (Dangl und Jones, 2001). Der von den R-Proteinen erkannte Effektor wird als Avr-Protein (Avirulenz-Protein) bezeichnet. Bisher ist aber nur sehr wenig über die Signale die zur Aktivierung der R-Gen vermittelten ETI notwendig sind bekannt. Die ETI stellt eine schnellere und stärkere Version der PTI (Tao *et al.*, 2003; Thilmony *et al.*, 2006; Truman *et al.*, 2006) dar und gipfelt häufig in einer *hypersensitive response* (HR), dem lokalen Zelltod der infizierten Zellen, wodurch der Rest der Pflanze geschützt wird (De Witt, 1997). Gegen nekrotrophe Pathogene, die ihre Wirte selbst töten um sich zu ernähren, zeigt sich die HR erwartungsgemäß wenig wirkungsvoll. Sie ist daher vermutlich gegen Pathogene mit einer biotrophen Lebensweise gerichtet (Glabrook, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Terminus Effektor nicht wertend betrachtet werden darf. Der Begriff impliziert nicht, ob die Aktivität dieser Proteine sich positiv oder negativ auf die Mikroben-Wirt-Interaktion auswirkt. Einerseits mittels Effektorproteinen die PTI überwunden und eine Infektion ermöglicht (ETS), andererseits initiieren diese Proteine auch erst die Mechanismen, die zu weitergehenden Abwehrreaktionen des Wirtes führen (ETI) (Kamoun, 2006, Hogenhout *et al.*, 2009). Im allgemein anerkannten *zig-zag* Modell beschreiben Dangl und Jones (2006) dass diese ambivalente Eigenschaft der Effektorproteine auf den evolutionären Rüstungswettkampf zwischen Pathogenen und ihren Wirtspflanzen zurückzuführen ist, der auch als treibende Kraft für die Entstehung immer wieder neuer Avr- und R-Gene erachtet werden kann.



2.3 Schematische Darstellung des angeborenen Immunsystems der Pflanzen

(a) Bei einer Infektion durch Pathogene werden die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) der Angreifer durch *pattern recognition receptors* (PRR) der Wirte erkannt. Dies führt zur Aktivierung einer MAP-Kinasen Kaskade, die über Transkriptions regulierende Schritte im Zellkern (ZK) schließlich in der *PAMP-triggered-immunity* (PTI) resultiert. Die Wirtszelle ist somit resistent gegenüber dem Angreifer.

(b) Einige Pathogene haben die Fähigkeit erworben Effektorproteine (E) zu sekretieren. Diese translozieren in die Zelle und können die PTI auf verschiedenste Weise inhibieren. Das Pathogen kann so die PTI überwinden, was für den Wirt die *effector-triggered susceptibility* und damit eine Infektion zur Folge hat.

(c) Wehren kann sich der Wirt jedoch, wenn er für das zum Effektor/Avr-Protein korrespondierende R-Protein (R) codiert. R-Proteine erkennen die Effektorproteine oder ihre Auswirkungen auf den Wirt und initialisieren die transkriptionellen Prozesse, die zur *effector-triggered immunity* (ETI) führen und dem Wirt resistent machen.

Neben dieser angeborenen Immunität der einzelnen Zellen, beruht der Schutz von Pflanzen vor Schädigung durch Pathogene auch auf systemischen Signalen (Dangl und Jones, 2001; Pieterse *et al.*, 2009). Sobald an der direkten Infektionsstelle eine Abwehrreaktion ausgelöst wurde, kommt es häufig in distalen Teilen der Pflanze zu einer systemischen Immunantwort, die das noch uninfizierte pflanzliche Gewebe schützt. Diese langanhaltende und breitgefächerte Abwehr wird als *systemic acquired resistance* (SAR) bezeichnet (Durrant und Dong, 2004, Pieterse *et al.*, 2009).

Charakterisiert wird die SAR durch koordinierte Aktivierung eines spezifische Sets von *PR*-Genen, von denen zahlreiche für Proteine mit antimikrobieller Wirkung codieren (van Loon *et al.*, 2006) Ihre Induktion erfolgt sowohl durch die PTI- als auch durch die ETI-vermittelte Erkennung der Pathogene und wird begleitet von lokal und auch systemisch erhöhten Level von Salicylsäure (SA). Phänotypisch sehr ähnlich zur SAR, ist die *induced systemic resistance* (ISR). Diese Form der systemischen Immunität, wird bei der Wahrnehmung der MAMPs von mutualistischen Mikroorganismen, wie z.B. den AM-Pilzen initiiert. Im Gegensatz zur SAR wird die ISR von Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) abhängigen Signalwegen reguliert. Wohingegen die SAR sich vor allem gegen biotrophe Pathogene richtet, konnte gezeigt werden, dass die ISR im Besonderen gegen nekrotrophe Pathogene und Insekten wirksam ist (Conrath *et al.*, 2006; Bakker *et al.*, 2007; Van Wees *et al.*, 2008; Van Wees *et al.*, 2008). SA, JA und ET nehmen somit eine prädominante Rolle in der Regulation der systemischen, angepassten Abwehrreaktionen der Pflanze ein. Die komplexen Netzwerke von Interaktionen zwischen diesen Molekülen konnten aber immer noch nicht vollständig durchschaut werden (Pieterse *et al.*, 2009).

2 Einleitung

2.4 Zielsetzung

Die Sekretion von Effektorproteinen die mit Abwehrmechanismen der Pflanzen interferieren, ist von herausragender Bedeutung für bakterielle, oomyceten und pilzliche Pflanzenpathogene für eine erfolgreiche Etablierung der Infektion. Besonders für obligat biotrophe Organismen, wie die AM-Pilze, die eine Langzeitbeziehung mit ihrem Pflanzenpartner verbindet ist es essentiell die Abwehrreaktion der Pflanze permanent zu unterdrücken. Nichtsdestotrotz konnte bisher bei der Suche nach Effektorproteinen in dieser nützlichen Symbiose kein wesentlicher Fortschritt erzielt werden. Bedingt ist dies sicherlich auch durch die komplizierte Handhabung und die fehlende molekularbiologische Zugänglichkeit der AM-Pilze.

Das Ziel dieser Arbeit ist es diese technischen Schwierigkeiten zu überwinden und die Existenz von Effektorproteinen auch in der AM zu belegen. Mittels eines molekularen Screens in Hefe (YSST, *Yeast Signal Sequence Trap*) soll das Sekretom des AM-Pilzes *G. intraradices* zu verschiedenen Stadien der Symbiose isoliert und auf mögliche Effektorproteine hin untersucht werden. Ausgewählte potentielle Effektoren sollen bezüglich ihres Wirkungsortes, ihres Wirkungsmechanismus und der Konsequenzen ihrer Effektorwirkung für die AM-Symbiose weiter charakterisiert werden.

Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge in der AM könnte den Weg für einen besseren Einsatz dieser nützlichen Pilze in der nachhaltigen Landwirtschaft ebnen. Desweiteren könnte ein Einblick in diese Prozesse bei einem mutualistischen Pilz zum Verständnis und der Kontrolle von nicht-nützlichen Pilz-Pflanze-Interaktionen beitragen.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 *Escherichia coli*

Alle *E. coli* Stämme in Flüssigkultur werden in LB-Medium unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Auf LB-Agarplatten erfolgt die Kultivierung bei 37°C im Feuchtinkubator. Den Medien werden zur Selektion auf die enthaltenen Plasmide die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

• DB3.1

Genotyp	F- <i>gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20</i> (_{rB-, mB}) <i>ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm _r) <i>xyl5 Δleu mtl1</i>
Eigenschaften	Streptomycin resistent (50 mg/L). Durch eine Mutation in der Gyrase (<i>gyrA462</i>) können Plasmide, die das <i>ccdB</i> _Gen enthalten kloniert werden

• Top 10

Genotyp	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL</i> (Str _R) <i>endA1 nupG</i>
Eigenschaften	Streptomycinresistent (50 mg/L). Geeignet für blue / white Screening.

• XL1-Blue

Genotype	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
Eigenschaften	Tetracyclinresistent (25 mg/L). Geeignet für blue / white screening.

3.1.2 *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobakterien werden unter Schütteln in TY- oder LB-Medium bei 28°C mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert.

• ARqua1

	Quandt, 1993
	Agropine-type pRiA4b (pA4-type) (250 kb)
Ri plasmid	pRiA4b, wt
Genotyp	Onc+, SmR, biotype II (Keane <i>et al.</i> , 1970)
Phänotyp	Streptomycin resistent (600 mg/l), Derivat des WT Stammes R1000 vom WT Stamm A4T (Moore <i>et al.</i> , 1979).

3 Material

Eigenschaften Induziert das wachstum von transgenen Wurzeln, die morphologisch dem WT entsprechen

3.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*

- **GV3101/pMP90** von Klaus Harter (Tübingen)
 - Ti plasmid pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA), Gm^R
 - Genotyp C58, Rif^R
 - Phänotyp Nopalin+, Gentamycin-resistent (40 μ g/ml), Rifampicin-resistent (100 μ g/ml)
 - Einsatz Transformation von *Nicotiana benthamiana*

3.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Untransformierte Hefestämme werden auf YPDA-Agarplatten bei 30 °C kultiviert. Flüssigkulturen zur Herstellung von kompetenten Zellen werden in 2x YPDA bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Transformierte Stämme werden in Saccharosemedium oder SD-Medium kultiviert, dem die entsprechenden Aminosäuren zur Selektion auf die Auxotrophiemarker fehlen.

• Y12321

Herkunft European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for functional Analysis (<http://cgi.server.uni-frankfurt.de/fb15/rose/index.html>)

Genotyp BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; lys2D0; ura3D0; YIL162w::kanMX4

• AH109

Herkunft J.K.C: Rose, Cornell Universität, Ithaca, USA

Genotyp MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : :GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 : :MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1

• Y187

Herkunft Clontech Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit

Genotyp Mat \square ; ura3-52; his3-200, ade2-101; trp1-901; leu2-3, 112; gal4 \square ; met \square ; gal80 \square ; URA3 : : GAL1UASGAL1TATA-lacZ; MEL1

3.1.5 *Glomus intraradices*

G. intraradices wird in monaxenischer Kultur zusammen mit Ri-transformierten *Daucus carota* Wurzeln auf M-Medium kultiviert (Bécard und Fortin, 1988).

• DAOM 181602

Herkunft Schenck and Smith (1982)

Genotyp wt.

3.1.6 *Aspergillus nidulans*

A. nidulans wird zur Anzucht in MM-Medium mit den entsprechenden Auxotrophiemarker bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

• RMSO11

Referenz	Stringer <i>et al.</i> 1991
Genotyp	pabaA1, yA2, Δ argB::trpC Δ B; veA1, trpC801

3.1.7 *Magnaporthe oryzae*

In dieser Arbeit wurde der Stamm ASGFP (Guy11-GFP) eingesetzt (Sesma und Osbourn, 2004). Dieser Stamm entspricht in seinem Verhalten und seiner Morphologie dem Wildtyp Guy11, exprimiert aber konstitutiv GFP wodurch er besser mikroskopisch untersucht werden kann. ASGFP wurde auf Kompletmedium bei 28 °C im Dunkeln kultiviert.

3.1.8 *Colletotrichum trifolii*

C. trifolii 2 MUT3930 (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008) wurde freundlicherweise von Richard O'Connell Max Planck Institute für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln zur Verfügung gestellt. Der Pilz wurde auf CM Medium bei Raumtemperatur kultiviert.

3.1.9 *Medicago truncatula*

Für die Versuche wurden mit dem Stamm ARqua1 von *Agrobacterium rhizogenes* transformierte Wurzeln des Kultivars Jemalong A 17 verwendet. Diese „Hairy roots“ werden auf M-Medium kultiviert.

• Jemalong A 17

Herkunft	Kultivar aus Australien
Genotyp	Wt, Myc+, Nod+, Fix+
	DMI1 (883 AS), DMI2 (925 AS), DMI3 (523 AS) (Penmetsa & Cook, 1997)

• C71(domi)

dmi1-1

EMS Nod-, Myc- Mutante von Jemalong A17. G1264A Punktmutation in der Spleißstelle des 3. Introns führt zu fehlerhaftem Spleißen (Penmetsa & Cook 1997; Ané *et al.*, 2004)

3 Material

- TR25

dmi2-1

g-ray Nod-, Myc- Mutante von Jemalong A17. Die Deletion einer Base führt zur Verschiebung des Leserasters und verfrühter Termination der Translation in der extrazellulären Domäne. (Sagan *et al.*, 1995; Endre *et al.*, 2002)

- TRV25

dmi3-1

g-ray Nod-, Myc- mutant of Jemalong A17. Eine 14 bp Deletion führt zu einem verkürzten Protein von 209 AS

(Lévy *et al.*, 2004)

3.1.10 *Daucus carota*

Mykorrhizierte *D. carota* Wurzeln wurden auf M-Medium kultiviert (Bécard und Fortin, 1988).

3.1.11 *Solanum tuberosum*

Die Kartoffelwurzeln enthalten durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation den Vektor pBin19 der das Promotor-Reporter-Konstrukt StPT3-FT-GUS trägt (Karandashov *et al.*, 2004). Die transformierten Kartoffelwurzeln werden auf M-Medium mit dem Petrischalenendeckel nach oben bei 27°C im Dunkeln inkubiert.

3.1.12 *Oryzae sativum*

In dieser Arbeit *Oryza sativa* L ssp. *indica* Kultivar CO39 verwendet. Die Samen wurden oberflächensterilisiert und auf Wasseragar zum Keimen gebracht.

3.2 Chemikalien

Alle anorganischen und nicht nachfolgend aufgelisteten Chemikalien wurden über die Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), MerckKgaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

3.2.1 Organische Chemikalien

Tabelle 3-1: Verwendete organische Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller: Katalognummer
1 kb DNA Ladder	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 15615-016)
3-Amino-1,2,4-triazol	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: A-8056)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranosid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: 8060-1)
Agarose Electrophoresis Grade	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 15510-027)
Agar-Agar (Kobe I pulv.)	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 5210.2)
Ampicillin Natriumsalz	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: K029.1)
Blocking Reagenz	(Roche, Cat.-# 1 096 176)
Bromphenolblau Natriumsalz	(SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg: 15375.01)
Chloramphenicol	(Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL: C0113)
DEPC, Diethylpyrocarbonat	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: K028.2)
dNTPs (peqGOLD dNTP-Set 4 x 25 μ mol)	(peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen: 20-2010)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 8043.2)
Ethidiumbromidlösung 1%	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 2218.2)
Formaldehyd 37%	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 7389.1)
Formamid deionisiert	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: P040.1)
Glycin	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 3908.3)
Hefeextrakt pulv f. d. Bakteriologie	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 2363.2)
Kaliumferricyanid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-9387)
Kaliumferrocyanid	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-8131)
Kanamycin Monosulfat	(Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL: K0126)
Kodak Dental Readymatic Developer	(Kodak GmbH, Stuttgart: 5285945)
Kodak Dental Readymatic Fixer	(Kodak GmbH, Stuttgart: 5285937)
L-Adeninhemisulfat	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: A-9126)
L-Arginin HCl	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: A-5131)
L-Histidin HCl Monohydrat	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: H-9511)
L-Isoleucin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: I-7383)
L-Leucin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: L-1512)
L-Lysin HCl	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: L-1262)
L-Methionin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: M-9625)
L-Phenylalanin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-5030)
L-Threonin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: T-8625)
L-Tyrosin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: T-0254)
L-Uracil	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: U-0750)

3 Material

L-Valin	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: V-0500)
Myo-Inositol	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: 5125)
Nikotinsäure	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: N-4126)
Phytigel (Gellam gum)	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P-8169)
Polyethylenglycol 3.350	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: P3640)
Pyridoxin-HCl	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: T914.2)
RNAlater RNA Stabilization Reagent	(Qiagen GmbH, Hilden: 76104)
RNaseOUT	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 10777019)
SDS /Natriumlaurylsulfat	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 4360.2)
Streptomycin Sulfat	(Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: S-6501)
Trypanblau	(Merck KgaA, Darmstadt: 1.11732.0025)
Trypton/Pepton aus Casein	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 8952.2)
Tween®20	(AppliChem GmbH, Darmstadt: A1389.0500))
X-GlcA Natriumsalz	(Apollo Scientific Ltd, Bredbury, GB: BIMB1121)
Yeast nitrogen base without amino acids	(Becton Dickison GmbH, Heidelberg: 0919-15-3)
β-Mercaptoethanol	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe: 4227.3)

3.2.2 Enzyme

Folgende Enzyme, die nicht Bestandteil eines verwendeten Kits sind, wurden in dieser Arbeit benutzt:

- Advantage®2 Polymerase Mix (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France: 630445)
- DNase I (Amplification Grade) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 18047-019)
- Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 11791020)
- GlucanX 200G (Novozymes Switzerland AG, Neumatt, Schweiz)
- Klenow-Fragment exo⁻ (Fermentas, Burlington, Kanada)
- MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec GmbH, Köln, Germany)
- *Pfu* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas, Burlington, Kanada)
- Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.:F-530S)
- Proteinase K (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- RNase H (Fermentas, Burlington, Kanada)
- SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Amersham Biosciences, Piscataway, USA:70173)
- SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe: 18064-022)

- T4 DNA Ligase (Promega GmbH, Madison, USA: M1801)
- Restriktionsendonucleasen (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.; Fermentas, Burlington, Kanada; (Boehringer, Mannheim; Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

3.2.3 Kits

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden: 69104)
- GeneRacer™ Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena AG, Jena: 845-KS-2060250)
- Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France: 630445)
- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden: 74904)
- TOPO TA Cloning® Kit (with pCR®2.1-TOPO® vector) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe: K4500-01)
- Qiaquick Gel Extraktion“ Kit (Qiagen GmbH, Hilden: 74904)
- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg: D4002)

3.2.4 Geräte

Tabelle 3-2 Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller / Lieferant
Cycler	Biometra Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern	i-Mupid	Cosmobio Co., Tokyo, Japan
	Mupid®exu	Cosmobio Co., Tokyo, Japan
Geldokumentation	TFX 40M	Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich
Heizblöcke	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
	Test Tube Thermostat Model TCR100,	Roth, Karlsruhe
	Techne DR1-Block DB.2A	Kleinfeld, Gehrden
Inkubatoren und Schüttler	Heraeus-Brutschrank Baureihe 6000,	Kendro, Langenselbold
	HT Infors,	Infors AG, Schweiz
	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
	Pflanzenwachstums-Schrank Binder KBW 400	Binder, Tuttlingen
Mikroskope und Kameras	Axio Imager. Z1 mit Axiocam	Zeiss, Göttingen
	SteREO Lumivar.V12 mit Axiocam	Zeiss, Göttingen

3 Material

	Axiophot mit Orca ER11	Zeiss, Göttingen; Hamamatsu, Herrsching
	Eclips E200	Nikon, Japan
Photometer	Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
	ND-100 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Reinraumbank	Kojair KH Open LAF Silver Line	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Waagen	Elektrische Laborwaage 440 Serie	Kern und Sohn GmbH, Deutschland
	Analysewaage Satorius research	Satorius GmbH, Göttingen
Zentrifugen	Tischzentrifuge Spectrafuge 24D	Labnet International, Inc., Oakham, Rutland, UK
	Kühlzentrifuge Eppendorf 5403	Eppendorf, Hamburg
	Kühlzentrifuge Beckman J2-21	Beckman Coulter, Krefeld
	Kühlzentrifuge Hermle Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
	VR-1 Speed Vaq – Vakuumzentrifuge mit CT 60e Kühlfalle	Heto Lab Equipment, Dänemark
	und Bauknecht Vakuumpumpe	MAGV GmbH, Rabenau

3.2.5 Verbrauchsmaterial

Nicht im folgenden aufgeführtes Verbrauchsmaterial wurde über die Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), A. Hartenstein (Würzburg), Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern), und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) bezogen.

Tabelle 3-3 Verbrauchsmaterial

Material	vollständiger Name	Quelle
Cellophan	Alba Einmach-Haut	Gehring & Neiweiser GmbH + Co KG, Bielefeld.
Röntgenfilm	Fuji Medical X-ray film	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
Nylonmembran	Hybond-N+	(Amersham Biosciences, Piscataway, USA:70173)

3.2.6 Lösungen und Puffer

- **Ampicillin-Stammlösung (1000x)**

100 mg/ml Ampicillin in H₂O dest. lösen, steril filtrieren (Filtergröße 0,45µm), bei – 20°C lagern.

- **ChloraminT-Lösung**

Zu einer 2% ChloraminT-Lösung werden 2 Tropfen Tween 20 (Sigma) gegeben und diese sterilfiltriert (Filtergröße 0,45µm).

- **DEPC- H₂O**

1 ml/L Diethylpyrocarbonat in H₂O bidest. über Nacht rühren und durch Autoklavieren inaktivieren.

- **Kanamycin-Stammlösung (1000x)**

50 mg/ml Kanamycin Monosulfat in H₂O dest. steril filtrieren, bei – 20°C lagern.

- **6 x Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren**

30 % (v/v) Glycerin, und 0,25 % (w/v) Bromphenolblau werden in destilliertem Wasser gelöst. Der Puffer wird bei 4 °C aufbewahrt.

- **LTHA Dropout Lösung (10x)**

200mg/L L-Arginin HCl

300mg/L L-Isoleucin

300mg/L L-Lysin HCl

200mg/L L-Methionin

500mg/L L-Phenylalanin

2000mg/L L-Threonin

300mg/L L-Tyrosin

200mg/L L-Uracil

1500mg/L L-Valin

- **Lösungen für die Minipräparation von Plasmiden**

Lösung I	50 mM TrisHCl pH 7,5
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A

Lösung II (Lysis Puffer)	0,2 M NaOH
--------------------------	------------

3 Material

1 % SDS

Lösung III

1,5 M KAc pH 4,8

• 10 x MOPS-Puffer

41,86 g MOPS (200 mM), 4,1 g Na-Acetat (50 mM) und 3,72 g Na₂EDTA (10 mM) werden in 1 l DEPC-Wasser eingewogen. Der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wird autoklaviert, wobei er eine gelbliche Farbe annimmt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Dunkeln.

• RNA Denaturierungspuffer

Für die Herstellung von 200 µl werden 100 µl Formamid, 33,2 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, 20 µl 10 x MOPS und 42,2 µl DEPC-H₂O durch Pipettieren gemischt. Der Puffer wird vor der Verwendung unter dem Abzug frisch angesetzt und auf Eis aufbewahrt.

• RNase „Killer“ Solution

0,1 M NaOH (4 g/L) und 2 mM EDTA (0,74 g/L) in destilliertem Wasser ansetzen.

• 10 % SDS

Zur Herstellung eines Liters 100 g Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) in 900 ml H₂O dest. einwiegen und unter Erwärmen lösen. Den pH-Wert mit HCl auf 7,2 einstellen und mit H₂O dest. auf einen Liter auffüllen. Bei RT lagern.

• 10x TAE-Puffer (pH 8,5)

242 g Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) sowie 37,2 g Na₂ EDTA. 2 H₂O in 4,5 l H₂O dest. werden zur Herstellung von 5 Litern eingewogen. Nach Zugabe von 57,1 ml konzentrierter Essigsäure wird mit Wasser auf 5 Liter aufgefüllt. Der Puffer wird in 1 x Konzentration verwendet.

• TE-Puffer (10x)

Um einen Liters herzustellen werden 800 ml H₂O dest. mit 100 ml 1M Tris-Puffer pH 8 und 20 ml 0.5 M Na₂EDTA pH 8 versetzt. Mit destilliertem Wasser wird auf 1 L aufgefüllt und steril autoklaviert. Der Puffer wird bei RT gelagert und in 1x Konzentration eingesetzt.

• Tetracyclin-Stammlösung (1000x)

25 mg/ml Tetracyclin in H₂O dest., steril filtrieren, bei – 20°C lagern.

- **1 M Tris-Puffer**

Zur Herstellung eines Liters 121,14 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) in 800 ml H₂O dest. einwiegen und gewünschten pH-Wert mit HCl einstellen. Mit H₂O dest. auf 1 L auffüllen, autoklavieren und bei RT lagern.

- **X- α -Gal-Stammlösung**

Für die X- α -Gal-Stammlösung wird X- α -Gal in einer Konzentration von 20mg/ml in Dimethylformamid gelöst und vor Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

- **IPTG-Stammlösung (5mM)**

Für die Supplementation von Medium zur Blau-Weiß-Selektion werden 50 μ l der Stammlösung pro Platte ausplattiert. Für die Zubereitung von 10ml Stammlösung werden 12mg IPTG in 10ml destilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 1ml Aliquots abgefüllt.

- **Zitronensäurepuffer zur Sporenisolierung**

17ml 0.1M Zitronensäure

83ml 0.1M Natriumcitrat

H₂O ad 1000ml

pH 6.6

- **Lösungen für den Southern Blot**

20x SSC	3 M NaCl
	0.3 M NaCitrat
	H ₂ O ad 1000 ml
	pH 7 mit konz. HCL

Maleinsäure Puffer	100mM Maleinsäure
	150mM NaCl
	pH 7,5 mit 10M NaOH

10x Blocking Solution	10% (w/v) Blocking Reagenz
	50% Maleinsäure Puffer
	Unter Rühren bis zum vollständigen Lösen erhitzen
	Autoklavieren

DIG Standard HYB Puffer	5x SSC
	0,02% (w/v) SDS
	1% Blocking Solution

3 Material

	0,1%(w/v) N-Laurylsarcosin H ₂ O ad 100 ml
2x Wash solution	2x SSC 0,1% (w/v) SDS H ₂ O ad 1000 ml
0,5x Wash solution	0,5x SSC 0,1%(w/v) SDS H ₂ O ad 1000 ml
Washing Buffer	Maleinsäure Puffer 0,3% Tween 20
Blocking Puffer	1% Blocking Solution in Maleinsäure Puffer
AP-Puffer	0,1 M TrisHCL pH 9,5 0,1 M NaCl 50mM MgCl ₂
AP-Substrat	Für eine Membran der Größe 10x10 cm: 500µl AP-Puffer 5µl CDP-Star

3.2.7 Kulturmedien

Alle beschriebenen Medien werden in destilliertem H₂O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Für die Herstellung der entsprechenden Festmedien wird 1,5% (w/v) Agar-Agar verwendet, falls nicht anders beschrieben. Bei Bedarf erfolgt die Zugabe von Antibiotikastammlösungen und anderer sterilfiltrierter Supplemente nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C.

• LB-Medium

Zur Kultur von *E. coli*:

10 g/L Trypton

10 g/L NaCl

5 g/L Hefeextrakt

pH 7.

- **SW-Basta**

Zur Selektion von *M. oryzae* Transformanten.

1.6 g/L Yeast Nwithout AA;

2g/L Asparagin

1g/L NH₄NO₃

10 g/L Glucose

40 µg/ml BASTA)

15 g/L Agar

pH 6 mit Na₂HPO₄.

- **M-Medium** (Bécard und Fortin, 1988)

Zur Kultur von *M. truncatula* und *Daucus carota* Wurzeln:

Tabelle 3-4 M-Medium

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	pro l Medium
Makronährstoffe			
KNO ₃	3,2 g/L	80 mg/L	25 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	29,24 g/L	731 mg/L	
KCl	2,6 g/L	65 mg/L	
KH ₂ PO ₄ 1	48 mg/L	4,8 mg/L	100 ml
Ca(NO ₃) ₂	115,2 g/L	288 mg/L	2,5 ml
Na-FeEDTA	3,2 g/L	8 mg/L	2,5 ml
Mikronährstoffe			
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	6 g/L	6 mg/L	1 ml
H ₃ BO	1,5 g/L	1,5 mg/L	
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,65 g/L	2,65 mg/L	
Weitere Mikronährstoffe			
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,0024 g/100 ml	0,0024 mg /L	100 µl
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,13 g/100 ml	0,13 mg/L	
Vitamine			
Glycin	0,3 g/L	3 mg/L	10 ml
Myo-Inositol	5 g/L	50 mg/L	
Nikotinsäure	50 mg/L	0,5 mg/L	
Piridoxin HCl	10 mg/L	0,1 mg/L	
Thiamin HCl	10 mg/L	0,1 mg/L	

Der pH wird auf 5,5 eingestellt. Für die *in vitro* Kultur von Wurzeln werden 10 g/L D-Saccharose zugegeben. Zur Herstellung des Festmediums wird 0,3 % (w/v) Phytigel verwendet.

3 Material

• SOC-Medium

Zur Transformation von Bakterienzellen:

5 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Trypton, 0,584 g/L NaCl, 0,186 g/ KCl, 2,4 g/L MgSO₄. pH 7,5. 20 ml sterile 20% (w/v) Glucose-Lösung werden nach dem Autoklavieren zugeben.

• Superbroth

Zur Anzucht von *E. coli* Zellen für die Herstellung kompetenter Zellen:

32 g/L Trypton

5 g/L NaCl

20 g/L Hefeextrakt

pH 7,5 mit NaOH.

• H₂O-Agar

Zur Keimung von *M. truncatula* Samen:

0,8% (w/v) Agar-Agar in H₂O dest.

• H₂O-Agar mit MES

Zur Keimung von *Glomus intraradices* Sporen:

1,952g MES, 8,76 ml 1M , 11,24 ml 1M NaCl in 800 ml doppelt destilliertes H₂O resuspendieren. pH auf 5,5 einstellen mit HCl. 8g Agar-Agar, H₂O ad 1000ml.

• Modifiziertes Fahraeus-Medium

Zur Sporeinduktion mit *M. truncatula* Samen

Tabelle3-5 modifiziertes Fähræus-Medium

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration	Pro l Medium
Makronährstoffe			
CaCl ₂	0.9 M	0.9 mM	1 ml
MgSO ₄	0.5 M	0.5 mM	1 ml
KH ₂ PO ₄	0.7 M	0.7 mM	1 ml
Na ₂ HPO ₄	0.4 M	0.8 mM	2 ml
Fe-Citrat	20 mM	20 µM	1 ml
NH ₄ NO ₃	1 M	0.5 mM	0,5 ml
Mikronährstoffe			
MnCl ₂	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
CuSO ₄	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
ZnCl ₂	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
H ₃ BO ₃	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl
Na ₂ MoO ₄	1 mg / ml	100 µg / L	100 µl

Der pH wird auf 7,5 eingestellt. Dem Medium werden 1,5% Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wird es als Schrägagar in Petrischalen gegossen.

- **YPDA**

Zur Kultur untransformierter Hefestämme:

20g/L Pepton, 10g/L Hefextrakt, 15ml der 100x Adenin-Stammlösung. pH 6,2. Nach dem Autoklavieren werden je Liter 50ml einer 40% (w/v) Glukoselösung sterilfiltriert hinzugefügt. Für Agarplatten werden aufgrund des niedrigen pH 20g/L Agar eingewogen.

- **Saccharose-Medium**

Zur Selektion von Hefestämmen mit transformiertem Signalpeptid:

10g/L Hefeextrakt, 20g/L Pepton, 20g/L Saccharose, 20g/L Agar.

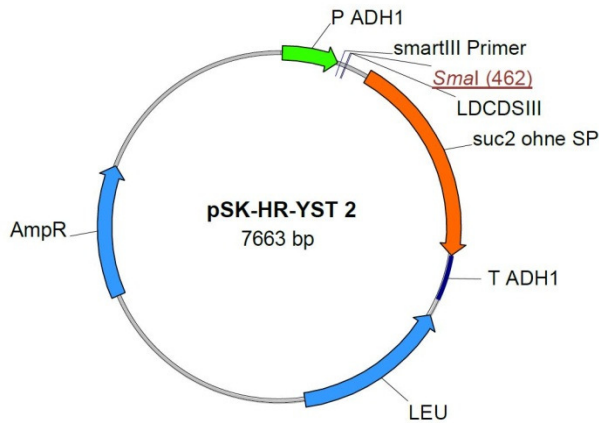
- **SD-Medium**

Selektionsmedium zur Kultur transformierter Hefestämme:

Für einen Liter werden 6,7g Yeast Nitrogen Base without amino acids, 100ml 10x -LTHA Dropout Lösung und die entsprechenden Volumina der noch zuzusetzenden Aminosäure-Stammlösungen mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH auf 6,2 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden 50ml einer 40% (w/v) Glukose- oder Saccharoselösung sterilfiltriert hinzugegeben.

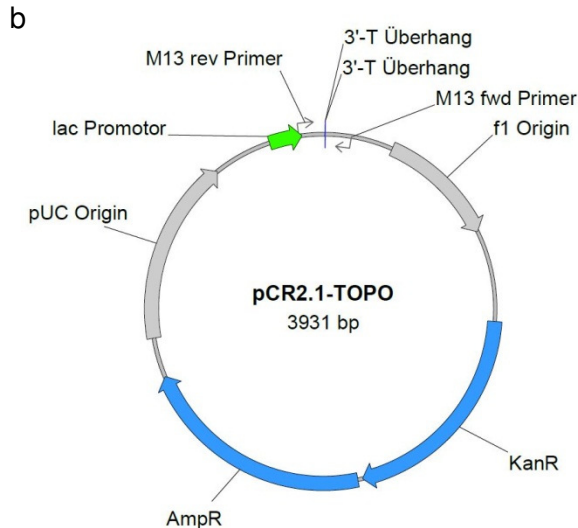
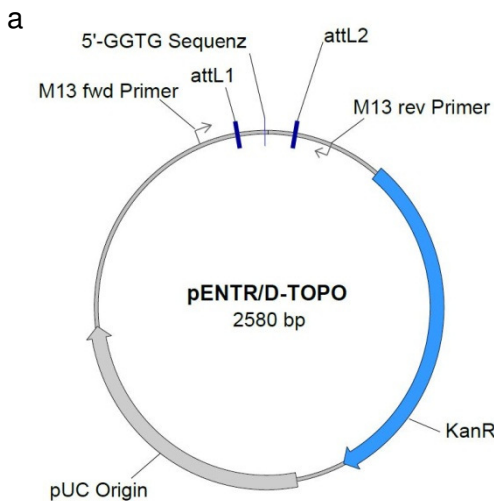
3 Material

3.2.8 Plasmide



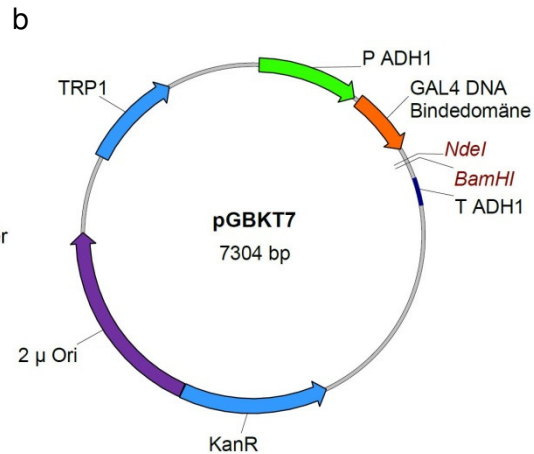
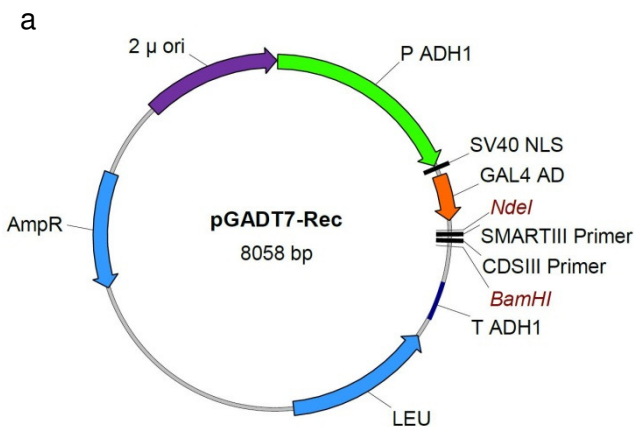
3.1 YSST Vektor für Hefe

Plasmid zur C-terminalen Fusion der Suc2 Invertase an amplifizierte (Primer smartIII und LDCDSIII) Klone einer cDNA-Bank. Der Vektor enthält Leucin (LEU) als Auxotrophie-Marker sowie den Alkoholdehydrogenase1 Promotor (P ADH1) und Terminator (T ADH1) zur Expression des Fusionskonstruktes.



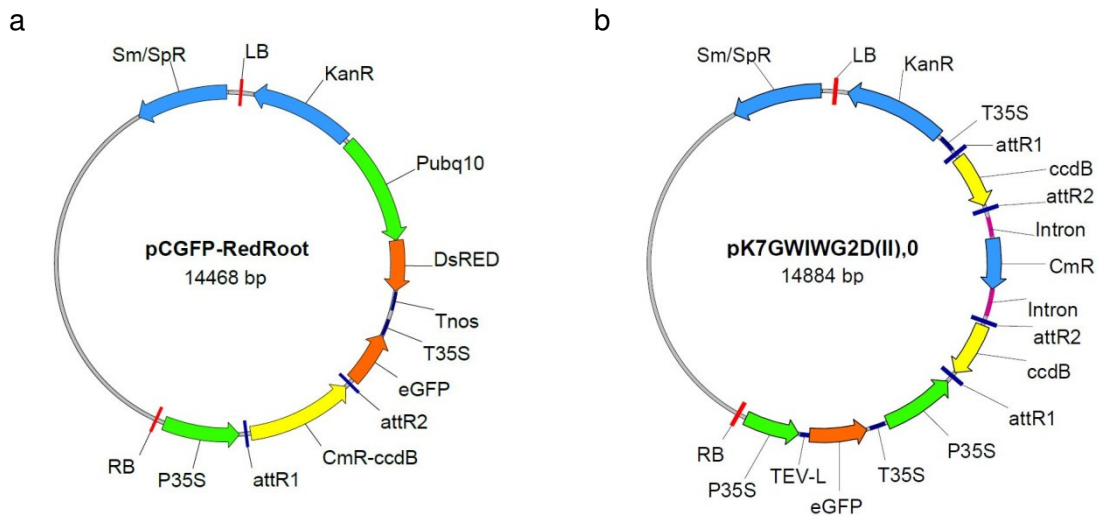
3.2 TOPO Vektoren pENTR/D-TOPO und pCR2.1-TOPO

(a) pENTR/D-TOPO zur gerichteten TOPO Klonierung von PCR-Fragmenten. (b) pCR2.1-TOPO zur TA-abhängigen TOPO Klonierung von PCR-Fragmenten.



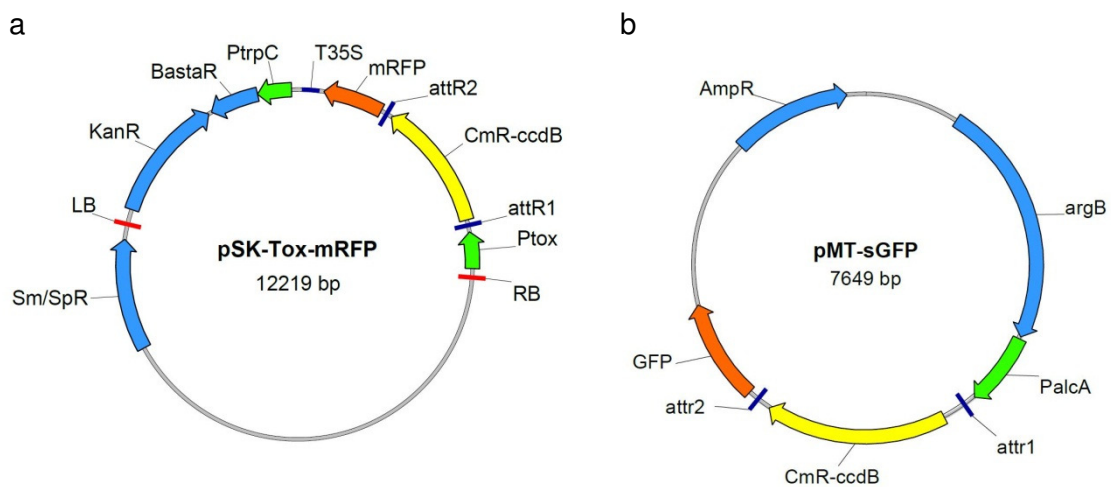
3.3 Vektoren für die Yeast Two Hybrid Analyse

Vektoren zur N-terminalen Fusion der GAL4 Aktivierungs-Domäne (a) oder DNA-Bindedomäne (b). Die Plasmide enthalten den 2 μ Replikationsursprung (2 μ Ori) zur Replikation in Hefe sowie Leucin (LEU) oder Tryptophan (TRP1) als Auxotrophie-Marker.



3.4 Plasmide pCGFP-RedRoot und pK7GWIWG2D(II),0

Gateway Vektoren zur C-terminalen eGFP-Fusion (a) sowie zur Konstruktion von RNAi-Konstrukten (b). Plasmide zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzen.



3.5 Plasmide pSK-Tox-mRFP und pMT-sGFP

(a) Gateway Vektor zur C-terminalen mRFP-Fusion und Transformation von *M. oryzae*. Der Plasmid enthält den *toxA* Promotor zur Expression des Fusionskonstruktes (Ptox) und den *Tryptophan C* Promotor zur Expression der Basta-Resistenz vermittelnden Phosphinothricin-Acetyltransferase (BastaR) in *M. oryzae*. (b) Gateway Vektor zur C-terminalen GFP-Fusion und Transformation von *A. nidulans*. Der Plasmid enthält den *alcA* Promotor zur Expression des Fusionskonstruktes (PalcA) und den Auxotrophie-Marker Arginin B zur Selektion in *A. nidulans*.

3 Material

3.2.9 Primer

Alle Primer wurden über Eurofins MWG Operon (Deutschland) bezogen und die Annealing Temperatur (T_m) entsprechend den Berechnungen des Herstellers festgelegt.

Tabelle 3-6 Primer

Name	Sequenz 5' -> 3'	GC(%)	T_m (°C)
CDS III/6 Primer	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGACATGNNNNNN (33bp)	61	74,5
SMART III	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTAT- GGCCGGG (39bp)	56	75,8
entr_SP7_SP_F1	CACCATGAAGTTCACGACTCTTGC (24bp)	50	62,7
entr_SP7_noSP_F2	CACCATGGCTCCTATTGCCGAG (22bp)	59,1	64
Race 3'PCR	GTATCGATGCCACCCTCTAGAGGCCG (27bp)	63	71
5'utr_SP7race_F1	TTCGAAAAATCTTCAGTTCGATCC (24bp)	38	57,6
3'utr_SP7race_R1	TAGATAACGAATAAGAGTTGGTGG (24bp)	38	57,6
SP_SP7_R1	CTCGGCAATAGGAGCAGCATTGA (23bp)	52,2	62,4
MtPR1_SS-F	CACCATGAGCTTTAGGTGTTT (21bp)	43	55,9
MtPR1_SSR2	TGTTCTGGGGGATCAGAAATTG (22bp)	45	58,4
MtPR1c3F	CACCATGATCCTCCTGGGAATTA (23bp)	48	60,6
MtPR1c3R	AGTATCCAATCAATAAGACCACATGC (26bp)	38	60,1
Bait_SP7F1_Ncol	TCCATGGCTCCTATTGCCGAGATC (24bp)	54,2	64,4
Bait_Rev_cds_EcoRI	GAATTCGATGCCACCCTCTAGAGG (24bp)	54,2	64,4
entr_MtERF19full	CACCATGTGTGGTGGTTGCTATC (23bp)	54,5	62,1
entr_MtERF19_R1	ATCAAAGCTCCATAAATCTCCAACC (25bp)	40	59,7
MtERF19-qPCR_F1	TAATCCTCCACCGATTGAC (20bp)	50	57,3
MtERF19-qPCR_R1	TCCATCACAGAAAAACCAACCT (22bp)	40,9	56,5
SP7-qPCR-F2	TGCATAATATTAATTTAGTTTCCTTTCC (28bp)	25	56,3
SP7-qPCR-R2	TAAGAGTTGGTGGGAGTGG (19bp)	53	56,7
MtTEF-qPCR-F3	TACTCTGGAGTGAAGCAGATG (22bp)	45	58,4
MtTEF-qPCR-R2	GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG (20bp)	55	59,4
GiTef_F1	TGTTGCTTTTCGTCCCAATATC (21bp)	43	55,9
GiTef_R1	GGTTTATCGGTAGGTCGAG (19bp)	45	56,7
RNAi_MtERF19_F1	CACCTAGCTGATACATCAAGC (21bp)	47,6	57,9
RNAi_MtERF19_R1	TCAACTCGTTCATTAACCTTTGG (22bp)	47,6	57,9

MtPR10-1-qPCR-F1	GTTGAAATTGTTGAAGGCAACG (22bp)	40,9	56,5
MtPR10-1-qPCR-R1	ATTGTGTCTGGAAGGCCAAC (20bp)	50	57,3
PBZ1/PR10-F	AATGAGAGCCGCAGAAATGT (20bp)	45	55,3
PBZ1/PR10-R	GGCACATAAACACAACCACAA (21bp)	42,9	55,9
RPR10b-F	TCTCCGTATTGCTGCTTCCT (20bp)	50	57,3
RPR10b-R	CACTCTCACAAAATCAAACACCA (23bp)	39,1	57,1
qPCR-OsTEF1-F1	CTCCAACCTCCAAGGATGAC (19bp)	52,6	56,7
qPCR-OsTEF1-R1	GTCTGTGCGATCTTGGTCAC (19bp)	52,6	56,7
Basta_for	ACTCAGGCCTCGACAGAAGATGAT (24bp)	48	63
XbaBasta_rev	TCTAGATGGCCCTAAATCTCGGTGA (25bp)	48	63
Basta_F1	TCCACGCTCTACACCCACCTG (21bp)	61,9	63,7

4 Methoden

4.1 *In vitro* Kultur Ri-transformierter mykorrhizierter *Daucus carota* Wurzeln

Aufgrund der obligat biotrophen Lebensweise von *G. intraradices* ist es nicht möglich den Mykorrhizapilz in axenischer Kultur (d.h. die Kultur eines Organismus ohne Zuhilfenahme eines anderen Organismus) zu halten. Für die *in vitro* Kultivierung des Pilzes existiert allerdings ein gut etabliertes System (Bécard und Fortin, 1988). Hierbei verwendet man *A. rhizogenes* transformierte Karottenwurzeln (*Daucus carota*) als pflanzlichen Wirt (Chabot *et al.*, 1992). Diese Wurzeln weisen eine als *hairy roots* bezeichnete Wurzelmorphologie auf und sind, aufgrund eines im Vergleich zu nicht transformierten Wurzeln veränderten Hormonhaushaltes, widerstandsfähiger und wachsen leichter auf künstlichen Nährböden (Tepfer, 1989). Zur Stammhaltung werden Wurzelstücke aus einer ca. 3 Monate alten, mit *G. intraradices* mykorrhizierten *D. carota* Kultur auf einer mit M-Medium mit Saccharose (M+S) gefüllten Petrischale unter sterilen Bedingungen platziert. Die Wurzelstücke sollten einen möglichst hohen Verzweigungsgrad, sowie eine leicht gelbliche Färbung aufweisen. Die Platten werden mit Parafilm umschlossen und mit dem Deckel der Petrischale nach unten zeigend, im Dunkeln bei 27°C inkubiert.

Die Isolierung pilzlichen Materials wird durch ein sogenanntes Zweikompartimentsystem ermöglicht (Abb. 4.1 a). Hierbei werden in einer durch eine Plastikbarriere zweigeteilten Petrischale ein Wurzel- sowie ein Hyphenkompartiment angelegt. Im Wurzelkompartiment sind in den mykorrhizierten Karottenwurzeln die symbiotischen Strukturen des Pilzes ausgebildet, die als Wachstumsgrundlage M+S-Medium benötigen. Die zweite Schalenhälfte soll den pilzlichen Hyphen und den von diesen gebildeten Sporen vorbehalten bleiben. Aus diesem Grund wird dieses Kompartiment mit M-Medium ohne Saccharose (M-S) gefüllt, in dem es den photosynthetisch inaktiven Wurzeln an der zum Wachstum notwendigen, externen Kohlenstoffquelle fehlt. Die biotrophen Pilze hingegen können ihren Kohlenhydratbedarf mit Hilfe ihres pflanzlichen Symbiosepartners decken. Zur Inokulation des Systems werden 3-4 ca. 1-2 Monate alte Wurzelstücke von den Stammhaltungsplatten entnommen, nahe der Kompartimentgrenze mit einer sterilen Pinzette platziert und bei 27°C im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 4 Wochen beginnen die Hyphen vom inzwischen vollständig mit mykorrhizierten Wurzeln bewachsenen Wurzelkompartiment aus, über die Barriere zwischen den beiden Schalenhälften hinweg, das zweite Kompartiment zu besiedeln, wo sie ein dichtes extraradikales Myzel mit zahlreichen Sporen bilden.

4.2 Anzucht pilzlichen Materials verschiedener Stadien der AM-Symbiose

Für den YSST zur Identifikation von sekretierten Proteinen in der AM-Symbiose wurden 3 cDNA-Banken erstellt, die sowohl die prä-symbiotische, sowie die frühe als auch späte symbiotische Phase der AM abdecken sollten. Die hierzu verwendeten Versuchsansätze zur Produktion pilzlichen und pflanzlichen Materials der verschiedenen symbiotischen Stadien sind in den Abschnitten 4.2.1 – 4.2.5 näher erläutert und in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Der Terminus „induziert“ beschreibt hierbei jeweils, die Koinkubation von pilzlichem Material mit *M. truncatula hairy roots*, wobei der Austausch von Signalen zwischen Pilz und Pflanzenpartner immer direkt möglich ist.

Tabelle 4-1 Übersicht über das für die cDNA-Synthese eingesetzte AM-symbiotische Material

Entwicklungsstadium	Material (Pilz/Pflanze)	Abbildung	Versuchsansatz
Prä-symbiotische Phase	Ungekeimte Sporen	4.1 a	4.2.1
Frühe symbiotische Phase	Gekeimte Sporen	4.1 b	4.2.2
	Induzierte Sporen	4.1 d	
	Hyphen	4.1 c	4.2.3
	Induzierte Hyphen	4.1 e	
Fortgeschrittene symbiotische Phase (<i>in planta</i>)	Arbuskel-angereicherte <i>S. tuberosum</i> Wurzeln	4.1 f	4.2.5

4.2.1 Isolation und Oberflächensterilisation von Sporen von *G. intraradices*

Die reifen, bräunlichen Sporen können direkt aus dem Hyphenkompartiment gewonnen werden, in welchem sie bereits mit dem bloßen Augen zu erkennen sind. Vor der Isolierung müssen die Sporen aber noch eine Phase der Dormanz von mindestens 14 Tagen bei 4°C durchlaufen. Nach dieser Kälteperiode wurde das Phytigel durch Rühren in dem dreifachen Volumen an Zitronensäurepuffer, pH 6, für mindestens 30 min aufgelöst. Die Sporen wurden über ein Siebssystem aus der Flüssigkeit gewonnen. Dabei wurde mit Sieben kleiner werdender Maschenweite gearbeitet (1mm, 125µm und 40µm), wobei jeweils der Siebrückstand der größeren Maschenweiten mit einem Stabmixer bearbeitet wurde um die Sporen von den Hyphen und Pflanzenresten zu befreien. Die schließlich im feinsten Sieb akkumulierten Sporen wurden eingesammelt und in 2ml Reaktionsgefäße zur Oberflächensterilisation abgefüllt.

Zur Sterilisation wurden die Sporen zunächst über Nacht in 1,5 ml Antibiotikallösung schüttelnd inkubiert. Die Antibiotikallösung wurde abgeschüttet und die Sporen mehrmals in sterilem Wasser gewaschen. Pilzliche Kontaminationen sollten durch eine 10-minütige Behandlung mit Chloramin-T-Lösung beseitigt werden. Auch diese wurde durch mehrmaliges waschen mit sterilem Wasser vollständig entfernt. Die Sporen können nun direkt zur Keimung ausgebracht, oder bis zu ihrer Verwendung in M-Medium ohne Saccharose bei 4°C gelagert werden.

4 Methoden

4.2.2 Keimung und Induktion von *G. intraradices* Sporen

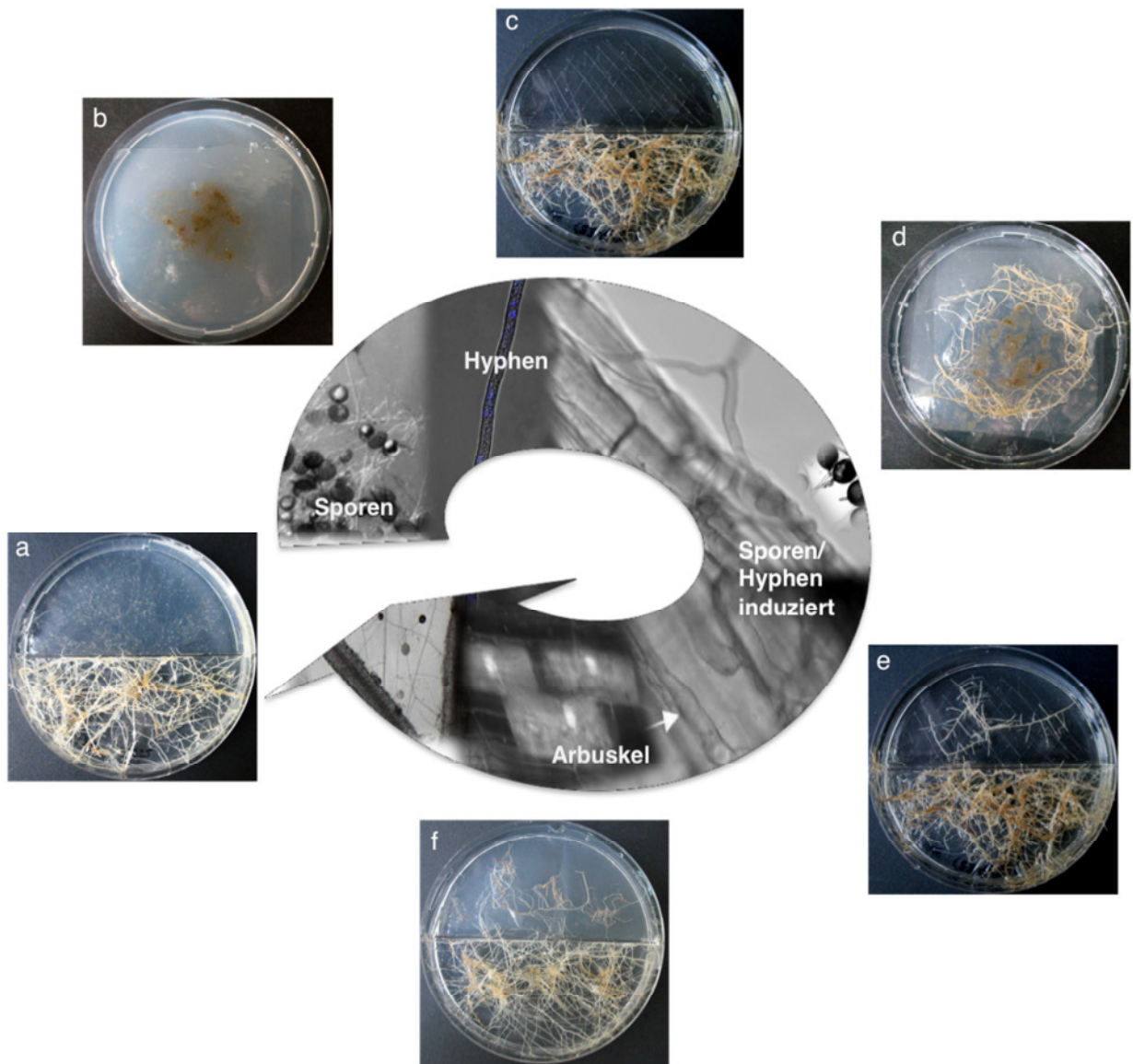
Die Sporenkeimung erfolgte auf 6x6 cm großen Cellophanstückchen, die unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette auf Wasseragarplatten mit MES platziert wurden. Auf diese Plättchen wurden die Sporen in einem kleinen Volumen an sterilem Wasser oder M-S Medium mit einer Pipette verteilt (Abb. 4.1 b). Die Keimung erfolgte bei 27°C. Nach 3 Tagen wurden die Sporen mit Hilfe eines Spatels wieder entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und die RNA extrahiert.

Zur „Induktion“ wurden um das Cellophanstückchen mit den Sporen *M. truncatula hairy roots* der Linie ARqua1 trapiert, mit einem weiteren Cellophanplättchen bedeckt und wie oben beschrieben inkubiert bzw. weiter verarbeitet (Abb. 4.1 d).

4.2.3 Isolation und Induktion extraradikaler Hyphen von *G. intraradices*

Für die Isolierung extraradikaler Hyphen wurde mit einer sterilen Pinzette das Medium aus dem Hyphenkompartiment des Zweikompartimentensystems entfernt. Dies kann bereits nach der Überwindung der Kompartimentgrenze durch die ersten Hyphen geschehen, aber auch noch, wenn diese bereits zahlreiche Sporen gebildet haben. Das Medium wurde durch flüssiges M-Medium ohne Saccharose ersetzt, bei dem alle Komponenten, mit Ausnahme des Phosphates, doppelkonzentriert zugegeben wurden. Zuvor wurde bereits der Boden der Petrischalenhälfte durch ein steriles Skalpell mit einem Gittermuster versehen. Dadurch soll es den Hyphen erleichtert werden den glatten Boden zu besiedeln. Die Platten wurden gründlich mit Parafilm verschlossen und bei 27°C im Dunkeln kultiviert. Nach etwa 1,5 Wochen wurden die mit einer sterilen Pinzette aus dem Flüssigmedium entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Zeitpunkt der Hyphenernte sollte allerdings vor dem Auftreten der ersten neu gebildeten Sporen liegen, um eine Vermischung der verschiedenen Stadien zu vermeiden.

Die Flüssigmedium-Platten eignen sich zudem um induziertes Hyphenmaterial heranzuziehen. Hierzu wurden in das bereits gut mit Hyphen besiedelte Flüssigmedium 2-3 Wurzelstücke von *Medicago truncatula* gelegt und Wurzeln und Pilze für drei Tage kokultiviert. Da es innerhalb dieser Zeit bereit zu Kontakten zwischen den Symbiosepartnern kommt, können die Hyphen nicht ganz so einfach geerntet werden. Zunächst wurde das Medium der Schalenhälfte abgegossen und 1ml RNA-later-Lösung auf die Hyphen pipettiert. Die Wurzelstücke wurden nun entfernt, wobei es teilweise notwendig war die Hyphen mit einer Pinzette von der Wurzeln zu lösen. Bei diesem Vorgang kommt sehr wahrscheinlich zur Überführung einiger pflanzlicher Zellen der unmittelbaren Kontaktstelle von Pilz und Pflanze. Im Anschluss darauf wurden die eingesammelten Hyphen durch Abtupfen von der RNA-later-Lösung befreit und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.



4.1 Anzucht pilzlichen Materials verschiedener Stadien der AM-Symbiose

Stilisiertes Lebenslauf von *G. intraradices*. Die Versuchsansätze zur Gewinnung symbiotischen Materials sind den entsprechenden Phasen des Lebenslaufes zugeordnet.

(a) Aus dem Hyphenkompartiment des Bikompartimentensystems werden die ungekeimten Sporen von *G. intraradices* gewonnen. Die ungekeimten Sporen repräsentieren die prä-symbiotische Phase der AM-Symbiose.

(b-e) Frühe symbiotische Phase der AM.

(b) Sporenkeimung auf Wasseragarplatten.

(c) Bikompartimentensystem mit Flüssigmedium zur Anzucht von Hyphen von *G. intraradices*.

(d,e) Induktion von gekeimten Sporen (d) und Hyphen (e) durch *M. truncatula* hairy roots.

(f) Mykorrhizierung von *S. tuberosum* hairy roots zur Gewinnung von arbuskel-angereichertem Material durch Mikrodissektion der Pflanzenwurzeln unter dem Binokular. Dieses Material repräsentiert die späte AM-Symbiose

4 Methoden

4.2.4 Keimung von *M. truncatula* und *O. sativa* Samen

Um an die Samen von *M. truncatula* zu gelangen, empfiehlt es sich die getrockneten Früchte der Pflanze durch Mörsern mit einem großen Pistill von ihren Stacheln zu befreien, um anschließend 7-10 etwa 3 – 5 mm große Samen aus den spiralig aufgerollten Hülsen gewinnen zu können. Durch eine Behandlung für ca. 10 – 15 Minuten mit konzentrierter Schwefelsäure in einem kleinen Becherglas werden die Samen einerseits Oberflächen sterilisiert, zum anderen wird ihre Dormanz vorzeitig gebrochen. Ein besserer Richtwert für eine ausreichende Inkubationsdauer als die Zeitangabe, ist die Beobachtung des Auftretens von schwarzen Flecken auf den Samen. Bei durchschnittlich 5 Spots kann die Behandlung abgebrochen und die Säure entfernt werden. Im Anschluss werden die Samen dreimal mit reichlich sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und zur Keimung auf einer H₂O-Agar Platte platziert und diese mit Parafilm verschlossen. Die Keimung erfolgt nach 24-48 h bei 27°C im Dunkeln. Um den Vorgang zu synchronisieren werden die Samen zuvor über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Samen *Oryza sativa* L ssp. indica Kultivar CO39 wurden vom Botanischen Garten der Universität Karlsruhe bezogen. Sie wurden vor dem Verwenden zuerst oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie eine Minute mit 70% Ethanol behandelt, dreimal mit sterilem dH₂O gewaschen, 10 Minuten mit Calcium-Hypochlorid (4%) inkubiert und nochmals dreimal mit dH₂O gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden auf Wasseragarplatten gegeben und für mindestens zwei Tage bei 4°C gelagert. Zur Keimung wurden die Platten bei 25°C bei Tag-Nacht Rhythmus (16 Stunden Licht, 8 Stunden dunkel) in einem Pflanzenwachstumsschrank inkubiert. Die Keimlinge wurden nach 3-4 Tagen für die Versuche verwendet.

4.2.5 Mykorrhizierung durch *Glomus intraradices*

Die Mykorrhizierung von *M. truncatula* Wurzeln, sowie von *M. truncatula* und *S. tuberosum hairy roots* wurde wie in Kuhn *et al.* (2010) beschrieben mit *G. intraradices* DAOM 197198 durchgeführt.

Durch das Promotor-Reporter-Konstrukt StPT3-FT-GUS (Karandashov *et al.*, 2004) können bei der Mykorrhizierung der in dieser Arbeit eingesetzten *S. tuberosum hairy roots* mykorrhizierte Bereiche anhand ihrer grünen oder roten Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzbinokular von nicht mykorrhizierten Bereichen eindeutig unterschieden werden. Mit sehr feinen Skalpellklingen wurden Wurzelbereiche mit ausgeprägter Arbuskelbildung unter dem Binokular geschnitten und die Wurzelfragmente sofort in RNA-later (Quiagen) überführt. Diese arbuskelangereicherten Wurzelstücke wurden für die Herstellung der cDNA-Bank, die repräsentativ ist für die späte symbiotische Phase, eingesetzt.

4.2.6 Quantifizierung des Mykorrhizierungsgrades

Die Quantifizierung des Level der pilzlichen Kolonisierung wurde wie in Kuhn *et al.* (2010) beschrieben mit dem Programm MycoCalc (Trouvelot *et al.*, 1986) durchgeführt unter Verwendung der Parameter: F% (Frequenz/ Dichte der Mykorrhizierung im Wurzelsystem), M%

(Intensität der Mykorrhizierung), A% (Abundanz der Arbuskeln), I% (Abundanz der intraradikalen Hyphen) und App% (Abundanz der Appressorien)

(<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalcprg/download.html>).

4.2.7 Infektion von *M. truncatula* mit *Colletotrichum trifolii*

Zur Inokulation von Pflanzen mit *C trifolii* wurde der Pilz zunächst für 7 Tage auf M-Medium herangezogen. *M. truncatula hairy root*-Linien wurden bedeckt mit Cellophan auf diesen Platten platziert und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten für jede Behandlung durchgeführt.

4.2.8 Behandlung von *M. truncatula* Wurzeln mit Pilzextrakten

Hyphen und Sporen (ca. 1 g) von *A. nidulans*, *M. oryzae*, *C. trifolii*, *G. intraradices* und Hefeextrakt (500 mg) wurden in flüssigen Stickstoff gemörsert und die resultierenden Extrakte in 4 ml M Medium (Bécard und Fortin, 1988) resuspendiert. *M. truncatula* Keimlinge wurden in diesen Suspensionen (oder nur M Medium) für 6 h bzw. 24 h inkubiert, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und die RNA für weitere Analysen extrahiert. Für den Extrakt aus *G. intraradices* Hyphen und Sporen wurde das Experiment in vergleichbarer Weise mit *M. truncatula hairy roots* wiederholt. Das Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten für jede Behandlung durchgeführt.

4.2.9 Expression of SP7 in *Magnaporthe oryzae*

Für die Expression von SP7 in *M. oryzae* wurde ein binärer Vektor konstruiert, basierend auf dem Rückgrat von pK7RWG2,0 (Karimi et al., 2002). SP7 wurde als mRFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des ToxA Promotors (über *HindIII/SpeI* Klonierung; entstammend aus pCAMGFP (Sesma und Osbourn, 2004)) exprimiert. Die BASTA-Kassette wurde mit den Primern Basta_for und XbaBasta_rev aus dem Vektor pFV9 (Villalba et al., 2008) amplifiziert und über *XbaI* kloniert. In den resultierende Vektor pSK-Tox-mRFP wurde SP7 rekombiniert und pSK-Tox-SP7-mRFP in den *M. oryzae* Stamm AS-GFP (Sesma und Osbourn, 2004) wie in Abschnitt 4.3.7 beschrieben transformiert und selektiert.

4.2.10 *In vivo* Sekretionstest von Effektorproteinen

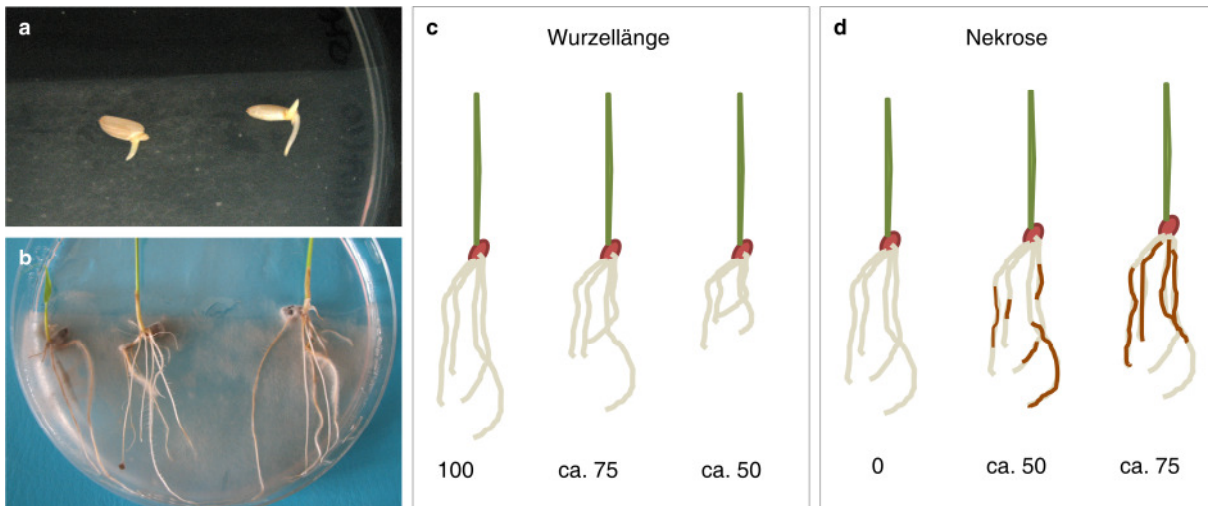
Der *in vivo* -Test auf Sekretion von Effektorproteinen durch *M. oryzae* erfolgte mit dem in Xu et al. (1997) beschriebenen Zwiebelzellen Penetrationstest (Zwiebelhäutchen Test). Die Methode wurde leicht modifiziert um an lebenden Zwiebelzellen durchgeführt werden zu können. Es wurde daher keine Fixierung der pflanzlichen Zellen mit Formaldehyd vorgenommen.

4.2.11 Infektion von Reiswurzeln durch *M. oryzae*

Die Infektion von Reiswurzeln wurde durchgeführt mit Hyphen von *M. oryzae* oder den SP7-exprimierenden *M. oryzae* Stämmen auf einer Cellophanmembran platziert auf Schrägagar-

4 Methoden

platten mit modifiziertem Fähræus Medium. Nach zwei Tagen wurden Keimlinge des Reiskultivars CO39 auf dem mit Hyphen bewachsenen Cellophan platziert und für eine Woche koinkubiert. Die Infektion wurde bezüglich ihrer Auswirkungen auf Wurzellänge und Fortschritt der Nekrose mit einem Bewertungssystem von 0-100 (Abb. 4.2. c,d) von acht unabhängigen Personen, ohne Kenntnis der Identität der Proben, beurteilt.



4.2 Infektion von Reiswurzeln mit *M. oryzae*

(a) Reis Keimlinge auf dem *M. oryzae* Hyphenrasen auf Cellophan.

(b) Wurzelinfektion durch *M. oryzae* nach 10 Tagen.

(c,d) Bewertungsrichtlinien zur Beurteilung der Wurzellänge (c) und Stärke der Nekrose (d).

4.2.12 Infektion mit Reisblättern durch *M. oryzae*

Reisblattinfektionen wurden wie in Heupel *et al.* (2010) beschrieben durchgeführt und 5 Tage nach der Infektion dokumentiert.

4.3 Transformationssysteme

4.3.1 Transformation von Bakterien

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden entweder käuflich erworben (Invitrogen, USA) und den Anweisungen des Herstellers entsprechend mit Plasmid-DNA transformiert oder mit der *simple and efficient*-Methode nach Inoue *et al.* (1990) selbst hergestellt. Für die Transformation wurden diese Zellen auf Eis aufgetaut, durch leichtes Rühren vorsichtig mit der Vektor-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min im Wasserbad bei 42 °C. Im Anschluss wurden 500 µl SOC-Medium dem Ansatz hinzu gegeben und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Elektrokompetente Zellen wurden nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1999) hergestellt. Die Transformation erfolgte unter Nutzung des Gene-Pulser II Systems (BioRad, USA) in 2 mm Küvetten (PepLab Biotechnology, Deutschland) bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV für ca. 5 msec. Die Zellen wurden nachfolgend in 500 µl SOC Medium für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Elektrokompetente Zellen von *Agrobacterium rhizogenes* wurden nach Mersereau *et al.* (1990) hergestellt und transformiert.

4.3.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

In *S. cerevisiae* wurde Plasmid-DNA nach dem Protokoll von Gietz and Woods (2001) eingeführt. Transformierte Hefezellen wurden entsprechend ihrer Auxotrophie Marker selektiert und kultiviert.

4.3.3 Transformation von *Aspergillus nidulans*

Da die stabile Transformation von *G. intraradices* derzeit noch nicht möglich ist, wurde der relativ einfach zu transformierende Ascomycet *A. nidulans* zur Untersuchung der Lokalisation des potentiellen Effektorproteins SP7 von *G. intraradices* zur Hilfe gezogen. Hierfür wurde der Vektor pMT-SP7 Δ SP-sGFP mittels PEG/CaCl₂-vermittelter Transformation (Yelton *et al.*, 1984) in den *A. nidulans* Stamm RMSO11 eingebracht. Die Transformanten wurden auf Minimal Medium mit KCl und p-Aminobenzoessäure (PABA) selektiert. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die positiven Klone in flüssigen Minimal Medium mit PABA und entweder 2% Glycerol, 2% Glucose oder 2% Threonin als Kohlenstoffquelle inokuliert und ÜN bei Raumtemperatur angezogen.

4.3.4 Erzeugung transgener *M. truncatula* Wurzeln

Für die Herstellung von *hairy roots* wurden Samen von *M. truncatula* oberflächensterilisiert und auf Wasser-Agar zur Keimung gebracht. Die Transformation erfolgte durch den *A. rhizogenes* Stamm ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993) ausgestattet mit verschiedenen binären Vektoren nach dem Protokoll von Boisson-Dernier *et al.* (2001). Zur Selektion der transformierten Wurzeln enthielten alle binären Vektoren im Bereich ihrer T-DNA sowohl die RedRood-Kassette zur konstitutiven Expression von DsRED1, als auch ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Unter dem Fluoreszenzbinokular wurden die neu gebildeten Wurzeln auf die Expression von DsRED1 untersucht, welche sich in einer deutlich sichtbaren roten Fluoreszenz der Wurzeln äußerte. Rot fluoreszierende Wurzeln wurden mit dem Skalpell isoliert und auf M Medium mit 25 µg/ml Kanamycin und Augmentin weiterkultiviert. Die Konzentration des Augmentins im Medium wurde hierbei von ursprünglich 400 µg/ml bei jedem umgesetzten der Wurzeln um 100 µg/ml reduziert.

4.3.5 RNAi und Überexpression von MtERF19 in transgenen *M. truncatula* Wurzeln

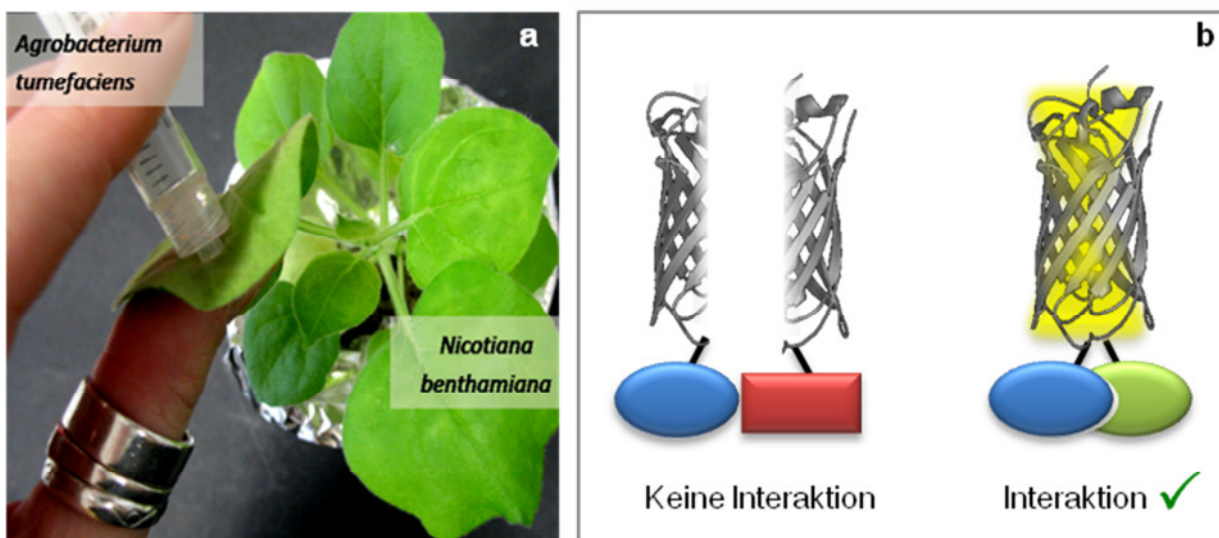
Für das *MtERF19* RNAi-Konstrukt wurde der binäre GATEWAY Vektor pK7GWIWG2D(II) (Karimi *et al.*, 2002) zur Expression von *hairpin*-RNA unter der Kontrolle des BMV 35s Promotors eingesetzt. Von *MtERF19* wurde mit den Primern RNAi_MtERF19_F1 und RNAi_MtERF19_R1 die Region -38 bp bis +196 bp (bezüglich des ATG) aus gDNA amplifiziert. Das Konstrukt wurde durch ATMT in *M. truncatula* exprimiert.

4 Methoden

Die Überexpression von MtERF19 wurde mit dem Konstrukt pCGFPRedRoot ausgeführt. Dafür wurde das vollständige ORF von MtERF19 mit den Primern entr_MtERF19full und entr_MtERF19_R1 amplifiziert und unter der Kontrolle des BMV 35s Promotors mittels ATMT in *M. truncatula* exprimiert.

4.3.6 Transformation von *N. benthamiana*

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* Blättern wurde mittels *A. tumefaciens* nach dem Protokoll von Voinnet *et al.* (2003) durchgeführt. Für *in planta* Lokalisationsstudien wurden die zu testenden Konstrukte im Vektor pCGFP-Redroot in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101/pMP90 transformiert. Zur Transformation der Tabakblätter wurde eine Zellsuspension dieses Agrobakterienstammes im Verhältnis 1:1 mit Suspensionen des Stammes K5A018 gemischt. Letzterer exprimiert das p19 Protein aus dem *tomato bushy stunt virus* zur Unterdrückung von Wirts induziertem Gene Silencing (Wei-xian *et al.*, 2008). Transformiert wurden mindestens je 2 Blätter von 4-6 Wochen alten Tabakpflanzen mit gesundem Aussehen und ohne Läsionen. Zur Vorbereitung auf die Transformation wurden die Pflanzen ca. 1 Stunde vor Beginn der vakuum-basierenden Infiltration (Abb. 4.3 a) sehr gut gewässert. Die Mischsuspension der beiden Agrobakterien Stämme wurde nach einer 2-4 stündigen Inkubationszeit auf Eis mit Hilfe einer 1 ml Spritze ohne Nadel direkt in die Unterseite der Blätter infiltriert, woraufhin sie sich in den Intrazellularräumen des Blattes ausbreitete. Nach 3 Tagen bei Raumtemperatur wurden die Pflanzen mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden entweder kleine Blattstücke oder nur die abgepeelte Blattepidermis auf einem Objektträger mit Wasser platziert oder und unter dem Licht- und Konfokalmikroskop untersucht.



4.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation in *N. benthamiana*

(a) Transiente Transformation von *N. benthamiana* durch Infiltration einer Agrobakterien Suspension in die Blattunterseite der Pflanze

(b) Das Prinzip der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation: Die beiden YFP-Fragmente können nur dann einen funktionsfähigen Fluorophor bilden, wenn ihre jeweiligen Fusionsproteine miteinander interagieren. Ist dies der Fall ist ein deutliches YFP-Signal zu detektieren.

Auch für die Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen *in planta* mittels Bimolekularer Fluoreszenz Komplementation (BiFC) (Abb.4.3 b) wurden Tabakblätter mit *A. tumefaciens* GV3101/pMP90 bzw. K5A018 transformiert. Die Transformation wurde wie in Schütze *et al.* (2009) beschrieben mit einem Verhältnis der Agobakteriensuspensionen von 1:1:1.

4.3.7 Protoplastentransformation von *Magnaporthe oryzae*

Die Transformation des *M. oryzae* Stamms ASGFP (Guy11-GFP) mit dem Vektor pSK-Tox-SP7-mRFP erfolgte mittels Protoplastentransformation. 100 ml flüssiges CM Medium wurden mit ca. 10 Stückchen des Myzels des entsprechenden Stammes beimpft und über 48h bei 26 °C langsam schütteln im Dunkeln inkubiert. Das Pilzmaterial dieser Vorkultur wurde durch filtern gesammelt, mit dem Skalpell zerkleinert um schließlich 50 ml Flüssigmedium mit Hyphen inokulieren zu können. Diese Kultur wurde ÜN, aber maximal für 16 h bei 26 °C unter leichtem Schütteln und lichtgeschützt angezogen. Zur Protoplastierung wurde das Myzel durch Abfiltration des Kulturmediums durch Miracloth wieder gewonnen, mit 200 ml Waschlösung übergossen und schließlich mit einem Spatel eingesammelt. In jeweils 4 Ansätzen wurden 0,5 g Myzel auf Eis mit 10 ml Osmotischen Medium mit Glucanex versetzt. Nach 1 h leichtem schütteln (110 rpm) bei 26 °C wurde die Protoplastenbildung unter dem Mikroskop überprüft, die nach 3 h unter den oben beschriebenen Bedingungen abgeschlossen sein sollte. Die eigentliche Transformation erfolgte nach dem in Villalba *et al.* (2008) beschriebenen Protokoll. Die Selektion der Transformanten auf Sweigard-Basta-Platten mit TB3-sw-Top-Agar durchgeführt und durch wiederholtes überimpfen der gewachsen Klone auf Sweigard-Basta und CM-Medium Platten überprüft. Die verbleibenden Klone wurden durch Southern Blot Analyse verifiziert und für weitere Versuche eingesetzt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolation genomischer DNA

Zur Präparation von genomischer DNA aus Hefe wurden zwei große Kolonien einer Hefekultur in 200µl DEPC-Wasser übertragen und durch Zentrifugation bei 7000 g für 1 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 500µl GlucanX-Lösung (120mg/ml GlucanX, 60mg/ml BSA) 1 Stunde bei 30 °C verdaut und anschließend, zur Entfernung der GlucanX-Lösung, erneut bei 700 g zentrifugiert. Die Extraktion der DNA erfolgt durch Zugabe von 300µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1). Hierzu wurde der Ansatz für 2 min gevortext und nachfolgend für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Mit dem resultierenden Überstand wurde der Extraktionsschritt wiederholt. Die DNA wurde gefällt und das getrocknete Pellet in 50-100µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Für die Isolation von gDNA aus *M. oryzae* wurden die Pilzstämme in 15 ml CM Medium inokuliert und für 2 Tage bei 27 °C inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde dann mit H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Zur Extraktion wurden 750 µl Extraktionspuffer zu pipettiert und der Ansatz für 30 min bei 68 °C inkubiert. Nach Zugabe von 375 µl 5M Kalium-Acetats und einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zelltrümmer durch

4 Methoden

Zentrifugation für 20 min bei 13 000 rpm abgetrennt. Die im Überstand befindliche gDNA wurde mit 800 µl Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und bei 13 000 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Zur Entfernung von RNA-Resten wurde ein RNase Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

Die gDNA aus *G. intraradices* Sporen und allen Pflanzenproben wurde nach Homogenisierung in flüssigen Stickstoff mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Zur Überprüfung der Qualität der DNA wurden von allen DNA-Proben je 2 µl auf ein 0,8 % Agarosegel geladen und im UV-Licht visualisiert.

4.4.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *S. cerevisiae*

Plasmid-DNA von *E. coli* wurde aus 3 ml ÜN-Kultur nach der Methode der Alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) gewonnen und in 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O resuspendiert. Bei Anwendungen die eine höhere Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA erforderten, wurde das NucleoBond PC 100 Plasmid-DNA Purifikations Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Hefezellen wurden 3 ml des entsprechenden Selektionsmediums mit einer Kolonie des Hefeklons beimpft und für 2 Tage bei 30°C und 220rpm kultiviert. Durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 1 min wurden die Zellen geerntet. Zur Lyse der Zellwand wurden die Zellen in 500µl GlucanX-Lösung (120mg/ml GlucanX, 60mg/ml BSA) resuspendiert und für eine Stunde bei 30°C verdaut. Die hieraus resultierenden Protoplasten wurden pelletiert, in 500µl der Lösung I für Plasmidpräparationen von *E.coli* resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 50µl einer 10% (w/v) SDS-Lösung wurde der Ansatz für 30 min auf 68°C gestellt. Zu den lysierten Zellen wurde daraufhin 200µl 5M Kalium-Acetat (pH 4,8) gegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und für eine Stunde auf Eis gelagert. Um das Kalium-SDS Präzipitat aus dem Ansatz zu entfernen, wird dieser zweimal 5min bei 13 300 rpm zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Überstand kann durch Zugabe von 750µl Isopropanol die DNA durch Zentrifugation für 10 min bei 13 300 rpm gefällt werden. Das Pellet wurde mit 500µl70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl H₂O gelöst.

Da Hefezellen Plasmide nur in begrenzter Zahl enthalten wurden 5µl der Plasmidpräparation in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert von wo sie zur Identifizierung in größerer Menge isoliert werden konnten. Hierbei sollten mindestens 3 der gewachsenen Kolonien zur Untersuchung ihrer Plasmide herangezogen werden, da Hefezellen bei der Transformation einer cDNA-Bank auch in der Lage sind mehrere verschiedene Plasmide aufzunehmen.

4.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA und RNA Proben erfolgte durch spektrophotometrische Messung der Absorption bei 260 und 280 nm mit dem NanoDrop-100 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität von Nukleinsäure-Präparationen sowie zur Bestimmung von DNA-Fragment Größen wurden DNA sowie RNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurde 0,8 – 2% (w/v) Agarose (Peqlab, Deutschland) in 0,5X TAE Puffer durch aufkochen gelöst. Die DNA Proben wurden vor dem Beladen der auspolymerisierten Gele mit 6x Ladepuffer versetzt. Der Gellauf erfolgte in 0,5X TAE Puffer im Mupid-ex U Elektrophorese System (Eurogentec, Belgien) bei einer Spannung von 50 – 135 V. Als Größenstandard für DNA-Proben wurden 5µl des 2log Markers in einer Konzentration von 0,1 µg/µl (New England Biolabs, UK) parallel aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel in 0,5X TAE Puffer mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden im UV Licht der Quantum Geldokumentationsstation (Peqlab, Deutschland) visualisiert.

4.4.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Um die im Agarosegel aufgetrennte DNA wiederzuerlangen wurden die spezifischen Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die eigentliche Extraktion erfolgte mittels der „freeze-squeeze“-Methode nach Thuring *et al.* (1975) oder mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corp., USA) nach dem Protokoll des Herstellers.

4.4.6 Restriktionsverdau von DNA

Im Standard Restriktionsansatz wurden 1µg DNA mit 1 Unit Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, UK oder Fermentas, Canada) in einem Volumen von 10 µl verdaut. Die Reaktion erfolgte für 1-2 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Bei Bedarf wurde das Enzym im Anschluss bei 68°C für 20 min Hitze inaktiviert.

In präparativen Verdauansätzen zur Weiterverwendung für Klonierungen wurden 10 µg DNA mit 10 Units der Restriktionsendonuclease für mindestens 2 Stunden geschnitten. Bei Fragmenten die durch den Verdau mit nur einem Restriktionsenzym erzeugt wurden, erfolgte dem Verdau nachfolgend eine Inkubation des Ansatzes mit 1 µl *shrimp alkaline phosphatase* (Fermentas, Kanada). Dieses Enzym führte während einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C zur Dephosphorylierung der DNA-Enden, womit eine Religation unterbunden wurde. Die linearisierten DNA Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 DNA Ligase

Ligationen wurden standardmäßig in einem Volumen von 20µl angesetzt. Der linearisierten Vektor- und Insert-DNA (1:3) wurde 1µl T4-Ligase (New England Biolabs, UK) sowie 10x Reaktionspuffer zugegeben und der Mix über Nacht bei 16 °C gehalten. Bei *blunt-end* Ligatio-

4 Methoden

nen wurden Plasmid und/oder Insert DNA für 15 min bei 37 °C mit 0,5 µl Exo-Klenow Fragment (Fermentas, Kanada) und 0,5 µl dNTPs (25 mM) inkubiert (Auffüllreaktion). Die Reaktion wurde gestoppt durch 10 minütiges Erhitzen bei 72 °C. Im Anschluss erfolgte die Ligation wie oben beschrieben.

4.4.8 Klonierung von PCR Fragmenten in pCR2.1/TOPO

Die Klonierung von PCR Produkte mit 3'A-Überhängen erfolgte wie im Handbuch des TOPO T/A Cloning® Kit PCR (Invitrogen, USA) beschrieben. Allerdings wurden jeweils nur 0,5 µl Vektor für eine Reaktion eingesetzt und die Inkubationszeit auf 30 min verlängert. Bei *blunt-end* PCR-Produkten wurden nach der eigentlichen PCR-Reaktion 3' A-Überhänge erzeugt. Hierzu wurden 0,25 µl Taq Polymerase dem Ansatz zugegeben und ein weiterer Elongationsschritt von 10 min bei 72°C durchgeführt.

4.4.9 Direktionales Klonen von PCR Fragmenten in pENTRD-/TOPO

Die Reaktion wurde wie in den Anweisungen des Herstellers beschrieben mit blunt-end PCR Fragmenten angesetzt. Es wurde anstelle von 1 µl des Vektors allerdings nur 0,5 µl eingesetzt und die Inkubationszeit wurde auf 30 min ausgeweitet.

4.4.10 LR Rekombination zwischen Entry-Klon und Destination Vektor

L/R Rekombinationen wurden mit dem Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

4.4.11 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA wurde durch Ethanol Präzipitation für 30 min bei -80 °C durchgeführt. Hierzu wurden zur DNA in dH₂O 1/10 Volumeneinheiten 3 M Natrium Acetates (pH 4,9) und 2,5 Volumeneinheiten 100% Ethanol pipettiert. Diese wurde im Anschluss durch einen Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

4.4.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard PCR-Reaktionen wurden in einem Ansatz von 25 µl mit der Taq-DNA Polymerase von *Thermus aquaticus* in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Eingesetzt wurden je 1 µl DNA (gDNA oder cDNA, bzw. eine 1:100 bis 1:1000 Verdünnung (1 – 10 ng/µl) von Plasmid DNA), 2 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl MgCl₂ (25 mM), je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl Polymerase sowie 16 µl DEPC- Wasser. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema bei einer Amplikongröße von bis zu 1 kb im Tpersonal Thermocycler (Biometra, Deutschland). Die Annealingtemperatur (T_m) der Primer wurde entsprechend der Berechnungen von Eurofins MWG Operon (Deutschland) festgesetzt. Bei PCR-Reaktionen mit unspezifischen Überhängen in den Primer Sequenzen wurden die ers-

ten 5 Zyklen bei einer niedrigeren T_m vollzogen, um das Binden der Primer dennoch gewährleisten zu können.

Bei Standard Anwendungen wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

5 min bei 94 °C für

30 sec bei 94 °C

30 sec bei der T_m der Primer

1 min je kb Länge bei 72 °C

10 min bei 72 °C

Schritt 2-4 wurden je nach Anwendungen 25-35 mal wiederholt.

Für PCR-Produkte die in Klonierungsreaktionen weiter verwendet werden sollten wurden Polymerasen mit Korrekturlese-Funktion wie die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes OY, Finnland) und die Pfu Polymerase (Fermentas, Kanada) entsprechend der Anweisungen der Hersteller eingesetzt.

4.4.13 Colony-PCR zur Selektion von positiven Transformanten

Zur Selektion von erfolgreich transformierten *A. rhizogenes* und *A. tumefaciens* Klonen wurden Einzelkolonien in 15 µl dH₂O aufgenommen und durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 2 µl des Überstandes wurden als Template in einer Standard PCR Reaktion (mit Plasmid spezifischen Primern) eingesetzt. Klone die das gewünschte Amplikon zeigten konnten zur Herstellung von *hairy roots*) verwendet werden.

4.4.14 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Zur Erlangung der vollständigen 3' cDNA Enden partieller cDNA Sequenzen wurde eine RACE-PCR auf cDNA die mittels des GeneRacer™ Kit (Invitrogen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers angefertigt worden war. Für die RACE-PCR zur Generierung der vollständigen 3' Enden der cDNA wurden der GeneRacer™ 3' Primer (R1) sowie ein vorwärts orientierter Genspezifischer Primer (F1) eingesetzt und eine Touchdown-PCR mit den folgenden Parametern durchgeführt:

2 min bei 94 °C für

30 sec bei 94 °C

1 min je kb Länge bei 72 °C

30 sec bei 94 °C

1 min je kb Länge bei 70 °C

30 sec bei 94 °C

30 sec 60-65

1 min je kb Länge bei 68 °C

4 Methoden

10 min bei 68°C

Schritt 2-3 sowie 4-5 wurden je 5 Zyklen wiederholt, Schritt 6-8 wurden für 25 Zyklen wiederholt.

Diese erste PCR wurde dann als Template für eine zweite *nested* PCR eingesetzt mit dem GeneRacer™ 3' Nested Primer und einem zweiten Gen spezifischen vorwärtsgerichteten Primer nach dem Standardprotokoll.

4.4.15 Isolation der Gesamt-RNA aus Pilz- und Pflanzenmaterial

Für die Gewinnung der gesamten RNA aus Pflanzenproben wurde jeweils maximal 100g frisches Ausgangsmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder mit Mörser und Pistill oder mit der Schwingmühle MM200 und 5mm Stahlkugeln aufgeschlossen. Die eigentliche Isolation der pflanzlichen RNA wurde mit dem innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Nach der Elution in 30 µl RNase freiem H₂O wurden 0,3 µl RNase Out (Invitrogen, USA) zum Schutz der RNA-Proben vor RNasen zugegeben.

Bei pilzlichen, sowie RNA later konservierten Pflanzenproben wurde die Trizol® Reagenz (Invitrogen, USA) zur Isolation der Gesamt-RNA eingesetzt. Maximal 100 mg des aufgeschlossenen Materials wurden mit 1ml des Trizol® Reagenz durch vortexen vermischt. Nach abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 13 000 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand für 5 min bei RT inkubiert. Zu den Proben wurden 200 µl Chloroform zugegeben, durch vortexen für 15 s gut vermischt und für 3 min bei RT belassen. Nach 15 min zentrifugieren bei 13 000 rpm und 4 °C zeigten sich zwei Phasen von welchen die wässrige obere Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dort erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C für 10 min. Das Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen, kurz in der Speed-vac getrocknet und sogleich in 50µl DEPC-Wasser, das mit 0,5µl des RNase-Inhibitors RNaseOUT versetzt wurde, resuspendiert.

Bei Hyphen von *G. intraradices* wurde das Probenmaterial direkt in der Trizol® Reagenz gemörsert und im Anschluss die sich im Mörser befindende Flüssigkeit auf 2-3 Reaktionsgefäße aufgeteilt, die dann wie oben beschrieben zentrifugiert wurden.

4.4.16 cDNA-Synthese

• cDNA-Synthese für RT-real-time PCR

Im Vorfeld der cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA, entsprechend der Empfehlungen des Herstellers, mit DNaseI (Invitrogen, USA) behandelt. Der vollständige Abbau der DNA in den RNA-Proben wurde überprüft durch eine Test-PCR auf die Haushaltsgene, die in der späteren real-time PCR als Referenzgene eingesetzt wurden.

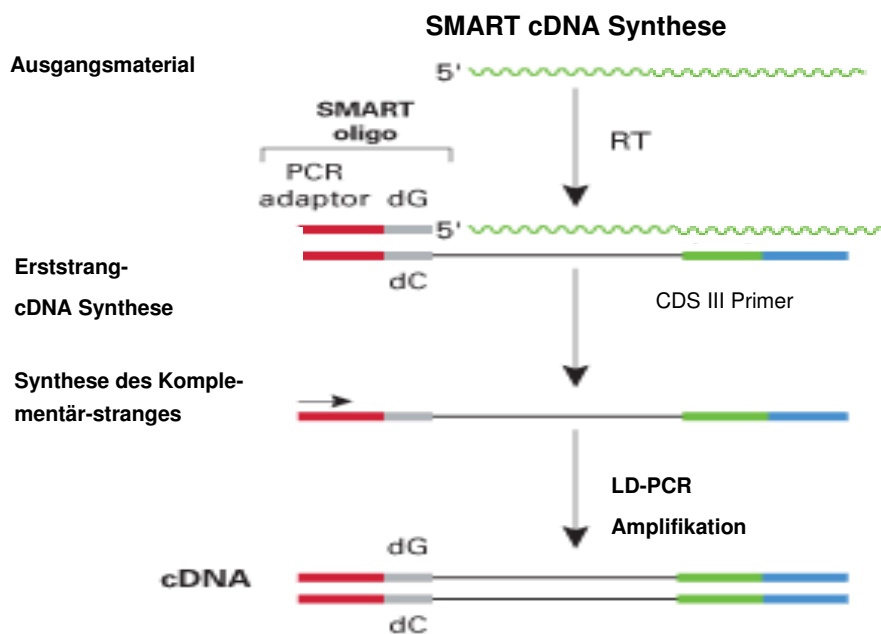
Bei vollständigem Verdau aller DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben wurde durch Zugabe von 1 µl Oligo(dt)-Primer (Invitrogen, USA) und 1 µl 10 mM dNTPs die Erststrang-cDNA Synthese durch das Binden der Primer bei 65°C für 5 min eingeleitet. Die eigentliche

Synthese wurde durch das Zugabe von 1 µl SuperScriptII™ Reverse transcriptase im Mastermix mit 1µl RNase OUT, ()mm DTT und 4µl 5x Puffer (alles von Invitrogen, USA) bei 42°C für eine Stunde vollzogen und bei 70°C für 10 min beendet.

• SMART-cDNA Erstrang-Synthese zur Erstellung von cDNA-Banken

Vor Einsatz in der Erstrangsynthese wurde die DNA-freie RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen nach dem Protokoll „RNA Cleanup“ aufgereinigt. und in 35µl RNase freiem Wasser eluiert. Dieser RNA-Mix wurde in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von ca. 10 µl eingedampft und dadurch aufkonzentriert.

Für die Erstrangsynthese wurden die Komponenten des Clontech Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits sowie die Reverse Transkriptase SuperScript II und deren 5x Erstrang-Puffer von Invitrogen benutzt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des SMART-cDNA- Synthese Kits (Clontech) mit den Primer SMARTIII und dem Hexamerprimer CDSIII/6 (Abb. 4.4). Die Verwendung dieses Random Primers ist essentiell für den späteren Einsatz der cDNA im YSST, für welchen cDNAs ohne Stopp-Codon aber mit vollständigem 5' –Sequenz benötigt werden. Der Mechanismus hinter der SMART-Technologie ist in Abb.4.4 dargestellt. Die Erstrang-cDNA wurde in 40µl TE-Puffer und entweder sofort für die LD-PCR eingesetzt oder bei -20°C für maximal drei Monat gelagert.



4.4 cDNA Synthese mit dem SMART-CDSIII-System

Ein modifizierter Oligo-dT- oder Hexamer-Primer (CDS III Primer) übernimmt die Erstrangsynthese der cDNA. Der SMART-Oligo dient hierbei als Template am 5'-Ende der mRNA. Erreicht die Reverse Transkriptase (RT) das 5' Ende vermittelt die Terminale-Transferase-Aktivität den Anbau einiger Desoxycytidin-Nukleotide. An diese bindet der SMART-Oligo, der eine Oligo-G-Sequenz an seinem 3' Ende enthält, und somit ein verlängertes Template für die RT bildet. Die resultierende Einzelstrang cDNA enthält nun das komplette 5' Ende der mRNA, sowie die Komplementärsequenz zum SMART-Oligo, die in der folgenden PCR Amplifikation als universelle Primerbindestelle dient.

4 Methoden

• Long-Distance PCR zur Amplifikation von cDNA

Da aus vielen Geweben von *G. intraradices* nur relativ wenig RNA gewonnen werden konnte, wurde das gesamte Material durch eine LD-PCR amplifiziert. Besonders Populationen von cDNA, die in der Erststrang cDNA eher selten vorkommen erhalten dadurch eine höhere Chance in der cDNA-Bank vertreten zu sein. Damit die cDNA-Bank dennoch die natürliche Verteilung der RNAs widerspiegelt, wurde die optimale Zyklenzahl ausgetestet werden. Für die Long-Distance PCR werden Komponenten des Advantage 2 PCR System von Clontech verwendet. Da ein Ansatz benötigt wird um die optimale Zyklenzahl für die Probe zu bestimmen, wurden jeweils mindestens zwei Ansätze zu je 100 µl mit folgenden Kompetenten pipettiert:

- 10µl Erststrang-cDNA vermischt mit TE-Puffer
- 62µl DEPC-Wasser
- 10µl 10x Advantage 2 PCR Buffer
- 8µl dNTPs (2,5mM)
- 4µl 5' PCR Primer
- 4µl 3' PCR Primer
- 2µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix

Die PCR wurde in einem Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

1 min bei 95 °C

15 sec bei 95 °C

6 min + (x - 1) * 5 sec bei 68 °C

10 min bei 68 °C

Mit zyklischer Wiederholung von Schritt 2-3 wie nachfolgend beschrieben.

Nach 15 Zyklen wurden aus einem Ansatz alle drei Zyklen 15µl Aliquots entnommen, während die anderen PCR Ansätze auf Eis gehalten wurden, um später mit der bestimmten, optimalen Zyklenzahl vervollständigt zu werden. Die entnommenen Aliquots werden zur Analyse auf ein 1,1% Agarosegel geladen. Bei optimaler Zyklenzahl liegt die Amplifikation noch im exponentiellen Bereich, die Größe der cDNAs nimmt aber nicht mehr signifikant zu.

4.4.17 Real Time quantitative PCR

Zur Analyse der Expressionslevel von Genen wurde die Methode der quantitativen Real-Time PCR angewendet. Die Reaktion erfolgte im iCycler MyIQ (Biorad, USA unter Verwendung des MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Belgien) mit einer Primerkonzentration von 0,2 pmol/µl in 25 µl Ansätzen. Als Template wurden 1:5 Verdünnungen von Einzelstrang cDNA. Die Primer für die qPCR wurden mit der Primer3 Software erstellt und auf optimalen Annealing Temperaturen getestet. Die Parameter für den PCR-Lauf wurden nach folgendem Schema festgesetzt.

95 °C für 3 min

95 °C für 30 sec

56 °C für 30 sec

72 °C für 30 sec

95 °C für 1 min

57 °C für 1 min

57-95 °C für 10 sec

Die Schritte 2-4 wurden für 40 Zyklen wiederholt.

Am Ende jeder qPCR wurde durch ein langsames Ansteigen der Blocktemperatur von 57-95 °C eine Schmelzkurvenanalyse zum Test auf unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere durchgeführt. Die real-time Reaktionen wurde routinemäßig in 3 biologischen sowie drei technischen Replikaten angesetzt. Die Kalkulation der relativen Expression erfolgte durch Normalisierung der Ct-Werte (threshold cycle) der entsprechenden Zielgene gegen die Ct-Werte eine Haushaltsgens.

$$\text{Relative Expression} = 2^{\text{Ct}_{\text{Housekeeping Gene}} - \text{Ct}_{\text{Target Gene}}}$$

Für *M. truncatula*, *O. sativa* und *G. intraradices* wurde der Elongationsfaktor alpha 1 (TEF) als Haushaltgen gewählt.

Die Induktion wurde mit der vergleichenden Ct –Methode entsprechend Livak *et al.* (2001) berechnet:

$$\text{Induktion} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{\Delta\text{Ct}_{\text{Gen I}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Gen II}}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Gen}} = \text{Ct}_{\text{Gen}} - \text{Ct}_{\text{Haushaltsgen}}$$

Biologische Relevanz wurde ab einem mindestens zweifachen Wechsel der Induktion erreicht. Fehler wurde als Standardabweichung kalkuliert.

4.4.18 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse wurde nach dem DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche Diagnostics GmbH, Germany) durchgeführt. Die Sonden wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) mit Genspezifischen Primern hergestellt.

4.5 Screen von cDNA Banken

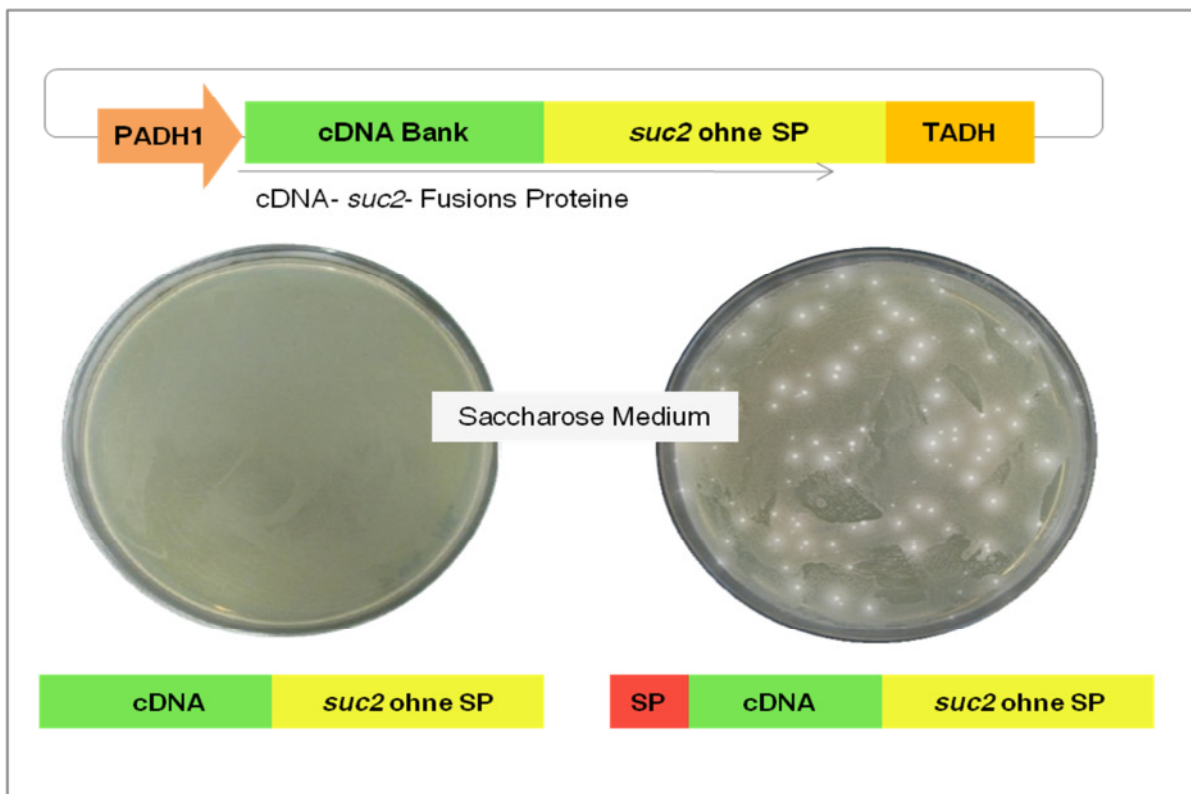
4.5.1 Die Yeast-Signal-Sequence-Trap (YSST) Methode

Der *Yeast Signal Sequence Trap* stellte eine sehr raffinierte Methode zur systematischen Suche nach Genen, die für sekretierte Proteine codieren. Eine effektive Methode zur Aufdeckung von Signalsequenzen wurde erstmals 1993 von Tashiro *et al.* beschrieben, sowie eine ähnliche, aber effizientere Methode von Klein *et al.* (1996) und Jacobs *et al.* (1997).

Die YSST Methode (Abbfundiert auf einem Enzym der Hefe: Die vom *suc2* Gen codierte Invertase katalysiert den Abbau von Saccharose zu Glucose und Fructose im Periplasmati-

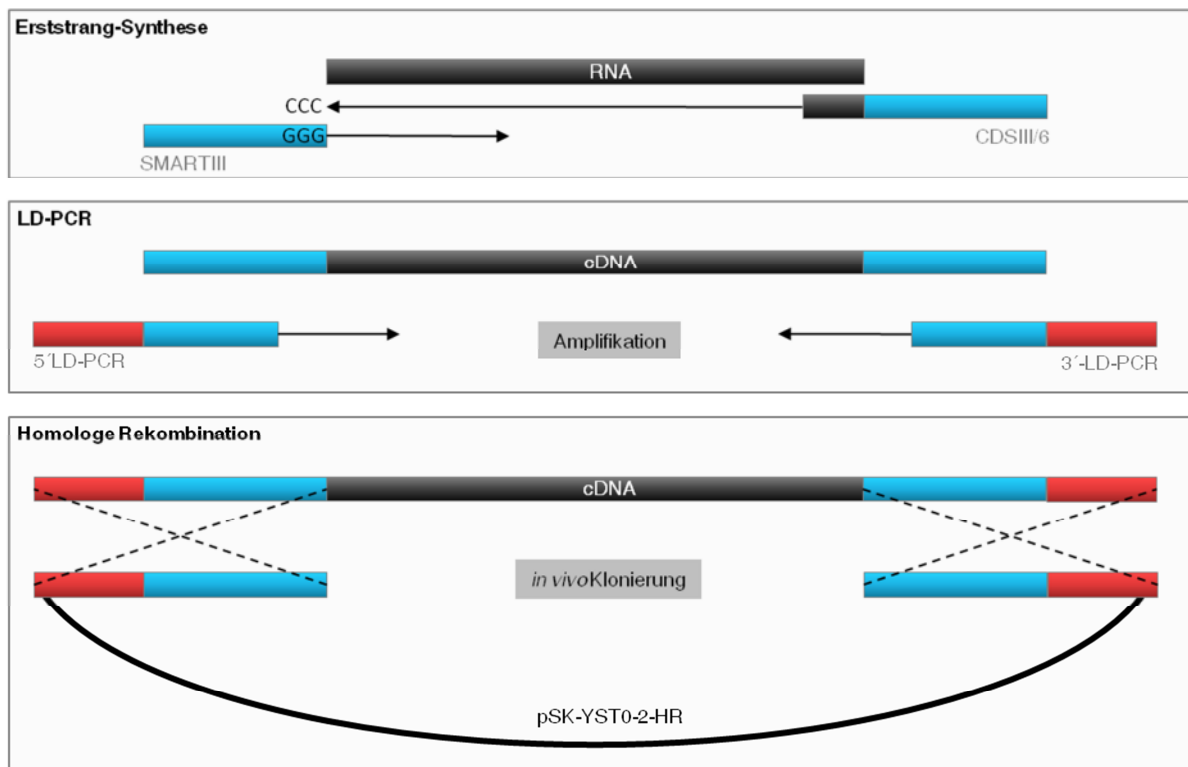
4 Methoden

schen Raum. Eine Deletion von *suc2* sowie eine Mutation in der Signalsequenz der Invertase resultieren in der Unfähigkeit der Hefemutanten auf einem Medium mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren führen zu einer Sekretion der Invertase in den periplasmatischen Raum dieser Hefemutanten. Nur wenn cDNA-Fragmente mit Signalpeptid im Leseraster vor das *suc2* Gen, dessen eigenes Signalpeptid deletiert wurde, inserieren, können die Hefemutanten auf einem Saccharose Medium wachsen und auf diese Weise leicht selektiert werden (Abb. 4.5). Durch Sequenzierung der klonierten cDNA-Fragmente können somit sekretierte Proteine elegant identifiziert werden. Für diesen Screen nach sekretierten Proteinen wurde die in Lee *et al.* (2006) beschriebene Methode modifiziert und für AM-symbiontisches Material optimiert. In die drei Vektoren des Vektorensystem p-YST0-2 von Lee *et al.* wurde über einen *EcoRI* und *XhoI*-Verdau jeweils die *multiple cloning side* aus pGADT7Rec eingeführt, resultierend in den Vektoren pSK-HR-YST0-2. Diese einklonierte Kasette enthält homologe Bereiche zu den Primern des SMART-cDNA-Synthese Kits (Clontech). Über solche homologen Sequenzen besteht in Hefe die Möglichkeit der direkten *in vivo* Klonierung der mit SMART-Primern generierten cDNA durch Homologe Rekombination (Abb. 4.6). Hierfür wurden die Vektoren mit *SmaI* linearisiert und mit den entsprechenden cDNA-Banken in den Hefestamm Y12321 nach dem Protokoll von Gietz and Woods (2001) kotransformiert.



4.5 Schematische Darstellung der Yeast Signal Sequenz Trap Methode

Hefekolonien des im Screen verwendeten Stamms können nur auf Saccharose Medium wachsen, wenn sie in der Lage sind das Enzym Invertase (codiert von dem Gen *suc2*) zu sekretieren. Dies ist nur der Fall, wenn eine cDNA mit Signalpeptid (SP) aus einer der AM cDNA-Banken das im SP deletierte *suc2* komplementieren kann.



4.6 cDNA-Synthese zur *in vivo* Klonierung mittels Homologer Rekombination

Zur Integration der cDNA Bank in das YSST-Vektorsystem werden für die Erststrangsynthese durch die reverse Transkriptase die Primer SMARTIII und CDSIII/6 verwendet, die die cDNA Bank mit zu den Vektoren homologen Adaptern ausstatten. Durch die LD-PCR wird die cDNA nicht nur amplifiziert, sondern auch der homologe Bereich ausgedehnt. Bei einer Kotransformation der so generierten cDNA-Bank und der linearisierten Vektoren kann direkt in der Hefe die Integration der cDNA-Fragmente über Homologe Rekombination erfolgen.

4.5.2 Yeast-two Hybrid Analyse (Y2H)

Der Y2H-Screen wurde entsprechend der Anweisungen des Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit von Clontech durchgeführt. Dabei wurde SP7 ohne Signalpeptid (SP7 Δ SP) als Bait Protein eingesetzt und gegen eine cDNA-Bank aus mit *G. intraradices* mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln (Diplomarbeit Torsten Klug) getestet. SP7 Δ SP wurde zu diesem Zwecke mit den Primern Bait_SP7F1_NcoI und Bait_Rev_cds_EcoRI amplifiziert und über einen *NcoI* und *EcoRI* – Verdau in den Vektor pGBKT7 integriert.

4.5.3 Der X- α -Galactosidase -Test

Der X- α -Gal-Test zur Quantifizierung der Interaktionsstärke wurde wie im X α -Gal Protocol – at – α -Glan ce (PT3353-2) von Clontech durchgeführt.

4.5.4 3-AT Test

Um zu vermeiden, dass Bait-Stämme auch ohne Interaktionspartner wachsen können, muss das Bait-Protein auf seine Transkriptionsaktivierungsfähigkeit getestet werden. Besitzt das Bait-Protein Transkriptionsaktivierungsfunktion kann es die Transkription des Reportergens HIS3 anschalten ohne zuvor mit einem Prey-Protein zu interagieren. Dies hat zu Folge, dass der Bait-Stamm auch ohne Interaktionspartner auf dem Selektionsmedium wachsen kann. Um dies zu vermeiden, setzt man dem Selektionsmedium 3-AT zu. Diese Substanz

4 Methoden

inhibiert kompetitiv das HIS3 Protein, so dass die Hefe nichtmehr wachsen kann. Allerdings sollten nur ganz geringe Menge des Inhibitors zugesetzt werden, damit die HIS3-Aktivität, die durch eine tatsächliche Interaktion zu Stande kommt, nicht vollständig gehemmt wird und tatsächlich positive Klone nicht mehr wachsen können. Daher muss die geeignete 3-AT-Konzentration für jedes Bait neu bestimmt werden. Dazu wird das Bait-Plasmid in den Hefestamm AH109 transformiert, da dieser Stamm das HIS3 Reporterkonstrukt im Genom trägt. Nun wird eine Kolonie von der Trafo-Platte gepickt und in 500 µl dH₂O resuspendiert. Von der Suspension werden jeweils 4 Tropfen à 1 µl auf SD/-Trp-His Platten mit verschiedenen Konzentrationen an 3-AT aufgetropft. Die Platten werden für eine Woche bei 30°C inkubiert. Als geeignete 3-AT-Konzentration wählt man diejenige aus, bei der die Kolonien nach 7 Tagen kleiner als 1 mm sind.

4.6 Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden entweder mit dem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss AxioImager Z1 durchgeführt oder mit dem Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 mit großem Arbeitsabstand und dem Wasserimmersions Objektiv HCX APO L U-V-I 63.0x0.90 WATER UV für eine bessere Auflösung. *A. nidulans* Proben wurden direkt auf dem Deckglas in den jeweiligen Nährmedien angezogen. Bei Wurzeln erfolgte die mikroskopische Analyse auf Objektträgern, bedeckt von Wasser und Biofolie. eGFP wurde mit einem Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittiertes Licht in einem Bereich von 496 nm bis 536 nm detektiert. DsRED1 wurde mit einem HeNe Laser mit 561 nm angeregt und das ausgesandte Lichtsignal von 568 nm bis 645 nm detektiert.

4.6.1 Tinte- Essig Färbung

Mit Hilfe der Tinte-Essig Färbung (Vierheilig *et al.*, 1998) können pilzliche Strukturen sowohl außerhalb als auch innerhalb des Pflanzen Gewebes angefärbt werden. Mykorrhizierte Wurzeln von *M. truncatula* wurden zur Klärung des Pflanzenmaterials zunächst mit 10% (w/v) KOH für 30 min bei 80°C behandelt. Vor der Färbung für 3 min mit 5% (w/v) Tinte (Pelikan, Brillant Schwarz,) in Haushaltssessig wurden die Wurzeln dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen um sie von KOH Rückständen zu befreien. Die Entfärbung der pflanzlichen Strukturen erfolgte in 10% Essig in Wasser unter leichtem schwenken ÜN. Für die Auswertung des Mykorrhizierungsgrades wurden die Wurzeln in 100% Glycerol auf Objektträgern plaziert.

4.7 *In silico* Analyse

Die Identifikation von homologen Proteinen erfolgte durch die NCBI BLAST Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Alignments wurden mit Jalview (<http://www.jalview.org/download.html>) unter Verwendung des Clustal W Web Service erstellt. Zur Identifikation konservierter Domänen wurden Motif-Scan ([52](http://myhits.isb-</p></div><div data-bbox=)

sib.ch/cgi-bin/motif_scan), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>) eingesetzt. Die Sekretion der Isolierten Proteine wurde mittels der SignalP Software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) oder bei nicht-konventioneller Sekretion mit SecretomP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) vorhergesagt. *M. truncatula* TC Sequenzen wurden im DFCI Medicago Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) identifiziert und ihre Expression im Medicago gene expression Atlas (<http://mtgea.noble.org>) überprüft. Genomische Sequenzen konnten durch die Aliniierung gegen die verfügbaren Genomdaten erhalten werden (http://medicago.org/genome/cvit_blast.php). Die BLAST Suche gegen die verfügbaren Sequenzierdaten von *G. intraradices* erfolgte über <http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/ClomusGenome/blast.php>.

5 Ergebnisse

Eine der interessantesten und am intensivsten beforschten Fragestellungen auf dem Gebiet der Mikroben-Pflanzen-Interaktionen war in den letzten Jahren die Erforschung jener Mechanismen, die pathogenen Pilzen erlauben die Abwehrreaktion ihrer pflanzlichen Wirte zu umgehen bzw. diese außer Kraft zu setzen. Mittlerweile ist es weitestgehend anerkannt, dass Pathogene für diese Zwecke, neben anderen Mechanismen, Effektoren produzieren, die das zelluläre Programm der Pflanzen zum Vorteil des Schädling manipulieren.

Die Vermutung liegt nahe, dass Effektorproteine auch in der AM-Symbiose eine entscheidende Rolle spielen. AM-Pilze sind nicht in der Lage ihren Lebenszyklus ohne ihren Wirt zu vervollständigen, weshalb sie eine Langzeitbeziehung mit ihrem pflanzlichen Partner verbindet. Um die Etablierung aber auch den Fortbestand von dieser zu sichern müssen diese Pilze fähig sein entweder aktiv oder passiv, durch Maskierung, der Abwehr der Pflanze entgegen zu wirken. Aufgrund der schwierigen labortechnischen Handhabung und fehlenden molekularbiologischen Zugänglichkeit der AM-Pilze konnte jedoch bisher kein wesentlicher Fortschritt bei der Suche nach Effektoren erzielt werden.

Aus Ermangelung eines assemblierten Genoms eines AM-Pilzes, wurde in dieser Arbeit Zugang zu den sekretierten Effektorproteinen durch Isolation des prä-symbiotischen und symbiotischen Sekretoms des AM-Pilzes *G. intraradices* gesucht.

5.1 Isolation sekretierter Proteine

5.1.1 Screen von cDNA-Banken mittels der Yeast Signal Sequence Trap (YSST) Methode

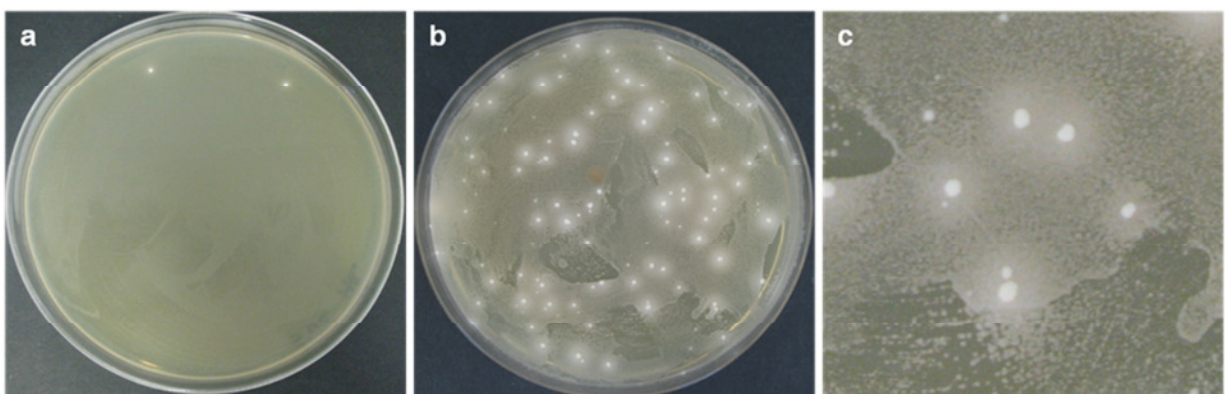
Zur Isolation sekretierter Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien der Symbiose wurde die Methode des *Yeast Signal Sequence Traps* (Jacobs *et al.*, 1997) eingesetzt. Dieser funktionelle Screen bedient sich eines Hefe-Mutantenstammes, der aufgrund einer fehlenden sekretierten Invertase nicht in der Lage ist auf Medium mit Saccharose als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Wird der Hefestamm jedoch durch Aufnahme einer heterologen cDNA, die zur Sekretion eines rekombinanten Invertase-Fusionsprotein führt, komplementiert, so ist ihm das Wachstum auf dem Saccharosemedium möglich. Von dort kann er isoliert und die für die Sekretion der Invertase verantwortliche cDNA identifiziert werden.

Diese Methode konnte bereits mehrfach erfolgreich zur Isolation von sekretierten Proteinen aus verschiedenen Organismen inklusive mit Pflanzen interagierenden Pilzen eingesetzt werden (Lee *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2008; Link und Voegele, 2008). Doch schon im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigten sich Schwierigkeiten darin diese Methode auf AM-Pilze anzuwenden. Da es bei diesen Organismen sehr schwer ist eine große Menge an Pilzmaterial zu gewinnen und somit auch nur eine begrenzte Menge an mRNA bzw. cDNA zur Verfüg-

gung steht, wurden intensive Bemühungen unternommen die Methode zu modifizieren um eine höhere Effizienz bei AM symbiotischen Material zu erzielen.

Um eine ausreichende Menge an cDNA bzw. eine gute cDNA-Bank zu generieren, wurde daher auf die SMART-cDNA-Synthese (Clontech) zurückgegriffen. Bei dieser Methode wird nach der Erststrangsynthese eine so genannte *Long-Distance* PCR (LD-PCR) durchgeführt, die der Amplifikation der cDNAs dient, wobei deren natürliche Verteilung aber weitestgehend beibehalten bleibt. Zudem wird der cDNA im Laufe der LD-PCR Adaptersequenzen verliehen, über welche sie direkt über homologe Rekombination in Hefe kloniert werden kann. Diese *in vivo* Klonierung in Hefe hatte sich dabei als effektiver erwiesen als die Klonierung einer cDNA-Bank in *E. coli* und Transformation dieser in Hefe, wie es im ursprünglichen Protokoll von Lee *et al.* (2006) durchgeführt wurde.

Grundvoraussetzung für eine Integration über homologe Rekombination ist das Vorhandensein homologer Sequenzen von Vektor und cDNA von mindestens 30 bp zu beiden Seiten des zu inserierenden Fragmentes. Um dies zu gewährleisten wurden in meiner Diplomarbeit für die cDNA-Synthese Primer eingesetzt, die die cDNA beiderseits mit zum Vektor homologen Sequenzen versehen. Allerdings wirkte sich diese Veränderung der ursprünglichen Primersequenz negativ auf die Menge der mittels SMART-cDNA-Synthese generierten cDNA aus. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das YSST-Vektorsystem pYST0-2 so modifiziert, dass in der Region der Insertionsstelle der cDNA homologe Bereiche zu den ursprünglich im SMART-Kit verwendeten Primern eingebracht wurden. Dies bietet weiterhin die Möglichkeit der *in vivo* Klonierung der cDNA-Bank in Hefe, gekoppelt aber mit dem Vorteil der cDNA-Synthese mit für das SMART-System optimierten Primern. Durch diese Modifikation der Vektoren konnte die Effizienz der YSST-Methode für AM symbiotisches Material maßgeblich verbessert (Abb. 5.1) und die Anzahl der auf dem Saccharose Medium auftretenden positiven Klone von 5 auf fast 600 (Tabelle 5-1) erhöht werden.



5.1 Optimierung der YSST-Methode

Hefekolonien, die eine zur Sekretion des Invertasefusionsprotein führende cDNA-Insertion enthalten, können auf dem Saccharose Medium wachsen.

(a) Nur wenige Kolonien konnten bei der *in vivo* Klonierung mit dem ursprünglichen pYST Vektorsystem detektiert werden (Diplomarbeit Silke Kloppholz, 2008).

(b) Die Modifizierung der Vektoren führte zur deutlichen Effizienzsteigerung der *in vivo* Klonierung in Hefe.

(c) Ausschnitt aus (b). Hefekolonien die in der Lage sind das Invertasefusionsprotein zu sekretieren, zeichnen sich aus durch einen „Sekretionskranz“ von Hefen aus, die von der Aktivität der Invertase im Medium nutzen.

Getestet wurden drei cDNA-Banken, die sowohl die prä-symbiotische, sowie die frühe als auch späte symbiotische Phase der AM abdecken sollten (Tabelle 5-1). Aus den auf dem

5 Ergebnisse

Saccharose-Medium gewachsenen Hefekolonien mit „Sekretionskranz“ (Abb. 5.1 c) wurden nach einem zweiten Wachstumstest die Plasmide isoliert, die cDNA-Insertionen mittels eines Verdauers auf Redundanz untersucht und anschließend sequenziert. Betreffend der Anzahl der Hefekolonien auf dem Saccharose-Medium verlief der YSST bei der cDNA-Bank „Sporen“ mit großem Abstand am erfolgreichsten. Dieser Erfolg ist vermutlich begründet durch die relativ große Menge an cDNA die für die *in vivo* Klonierung zur Verfügung stand. Die Sporen von *G. intraradices* repräsentieren das einzige Entwicklungsstadium des Pilzes welches keinen Pflanzenpartner benötigt. Daher ist es relative einfach dieses Material zu isolieren und eine gute mRNA daraus zu gewinnen. Hingegen erweist es sich als sehr viel schwieriger Material, das mit Pflanzen in Kontakt stand oder sogar symbiotisches Pilzmaterial aus der Pflanze zu gewinnen. Sichtbar wird dies deutlich an der wesentlich geringen Zahl an Kolonien bei den cDNA Banken „Induziert“ und „Arbuskel-angereichert“. Nichtsdestotrotz konnte die größte Anzahl an verschiedenen Klonen aus der cDNA-Bank „Induziert“ gewonnen werden. Dies lässt darauf schließen, dass besonders in der frühen symbiotischen Phase, in der die Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze besonders wichtig erscheint, eine Vielzahl an verschiedenen sekretierten Proteinen produziert wird.

Tabelle 5-1 Übersicht über die im YSST getesteten cDNA-Banken

Entwicklungsstadium	c-DNA Bank	Kolonien	Unterschiedliche Klone (Pilz/Pflanze)
Prä-symbiotische Phase	Ungekeimte Sporen (S)	596	3/0
Frühe symbiotische Phase	Induziert (I)	150	16/4
Fortgeschrittene symbiotische Phase (<i>in planta</i>)	Arbuskel-angereichert (A)	98	2/1

Mittels SignalP-Software wurden die Proteinsequenzen auf das Vorhandensein einer Signalsequenz zur Einspeisung in die sekretorische Maschinerie der Zelle überprüft. Falsch positive Sequenzen, bei denen es durch eine Verschiebung des ORF zufällig zu einer als Sekretions-Leader tauglichen Sequenz kam, konnten somit aussortiert werden. Zunächst erstaunlich, konnte für die Klone SP10, SP78 und SP66 (Tabelle 5-2) keine Signalsequenz ermittelt werden. Allerdings kann laut dem Programm SecretomeP bei diesen Proteinen die Sekretion über einen nicht konventionellen Sekretionsmechanismus erfolgen. Die Unterscheidung zwischen cDNAs pilzlichen bzw. pflanzlichen Ursprungs wurde hauptsächlich anhand des GC-Wertes vorgenommen, welcher bei *G. intraradices* mit 37% im Vergleich zu 42% bei *M. truncatula* und *S. tuberosum* bemerkenswert tief liegt.

Die Tabellen 5-1 und 5-2 bieten eine Übersicht über alle mit Hilfe der YSST-Methode aus AM- symbiotischen Material identifizierten, sekretierten Proteine. Es wurden drei verschiedene cDNA-Banken, repräsentativ für verschiedene Phasen der symbiotischen Entwicklung, untersucht. Aus der cDNA-Bank „Induziert“ konnten mRNAs codierend für 20 verschiedene Proteine gewonnen werden. Hiervon waren 20% der mRNAs pflanzlichen Ursprungs und 80% entstammten pilzlicher Natur. In der cDNA-Bank aus *G. intraradices* Sporen konnten hingegen nur drei für sekretierte Proteine codierende cDNAs mittels YSST detektiert werden.

Darunter nur ein Protein (YT-S11), welches nicht auch aus der cDNA-Bank „induziert“ gewonnen werden konnte. In der cDNA-Bank aus arbuskel-angereicherten Kartoffelwurzeln konnte die mRNA zweier pilzlicher und eines pflanzlichen sekretierten Proteins identifiziert werden. Die Sequenz pflanzlichen Ursprungs (SP12), war hierbei allerdings in 90% aller untersuchten Hefeklone vorzufinden. Auch unter den in der cDNA-Bank „induziert“ identifizierten Klonen, war dieses Protein das am häufigsten isolierte.

Tabelle 5-2 Übersicht aller mit Hilfe der YSST-Methode isolierten Proteine

Klone pilzlichen Ursprungs sind rot gekennzeichnet, pflanzliche Klone sind rot markiert. Für die grau hervorgehobenen Klone wurde bioinformatisch ein Kernlokalisierungssignal vorhergesagt. Dies Klone stellen interessante Kandidaten für Effektorproteine in der AM dar. cDNA-Banken (vgl. Tabelle 5-1): Sporen (S), Induziert (I), Arbuskel-angereichert (A).

Klon	cDNA Bank	Homologie (Blastx NCBI)	E-Wert
SP1	I	XP_001874952 Kohlenhydrat-Binde-Modul Familie19 Protein [<i>Laccaria bicolor</i>]	3e-09
SP2	I	ref YP_324462.1 MscS Mechanosensitiver Ionen Kanal [<i>Anabaena variabilis</i>]	3.6
SP7	I, S, A	XM_001351562 Putative 3D7 P-Typ ATPase [<i>Plasmodium falciparum</i>]	5e-04
SP10	I	ref NP_228520.1 Hypothetisches Protein TM0711 [<i>Thermotoga maritima</i> MSB8]	0.29
SP11	I	gb ABT18099.1 FERONIA Rezeptor-ähnliche Kinase [<i>Cardamine flexuosa</i>]	7e-04
SP12	I, A	X91836.1 Extensin [<i>Vigna unguiculata</i>]	5e-06
SP14	I	Keine signifikante Homologie	-
SP17	I	Keine signifikante Homologie	-
SP20	I, S, A	Keine signifikante Homologie	-
SP31	I, A	Keine signifikante Homologie	-
SP33	I	gb AAY84873.1 Alternatives Splicing Regulator [<i>Ixodes scapularis</i>]	2e-12
SP34	I	ref YP_698204.1 CAAX Aminoterminale Protease Familie Protein [<i>Clostridium perfringens</i>]	2.3
SP42	I	XP_002200440.1 Galectin 3 [<i>Taeniopygia guttata</i>]	1.7
SP44	I	ref YP_147014.1 Hypothetisches Protein GK1161 [<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426]	5.5
SP66	I	ref XP_426389.2 RPUSD2 Protein [<i>Gallus gallus</i>]	5e-28
SP69	I	emb CAC19793.1 53BP1 Protein [<i>Xenopus laevis</i>]	8.5
SP75	I	emb CAO46825.1 Nicht benanntes Protein Produkt [<i>Vitis vinifera</i>]	3e-29
SP78	I	Keine signifikante Homologie	-
SP151	I	emb CAA92208.1 Hydrophobin I [<i>Hypocrea jecorina</i>]	5e-07
SP152	I	gb AAF91322.1 Rezeptor-ähnliche Kinase [<i>Glycine max</i>]	5e-127
YT-S 11	S	Keine signifikante Homologie	-

Die Identität der durch die mRNAs codierten Proteine wurde durch die BLAST-Suche nach homologen Proteinen bestimmt. Unter den ermittelten Homologen befanden sich unter anderem ein Kohlehydrat-Binde-Protein (SP1), ein mechanosensitiver Ionenkanal (SP2) und ein Hydrophobin (SP151). Auch unter den Proteinen pflanzlichen Ursprungs befanden sich mit den Klonen SP11 und SP152 zwei Rezeptor-ähnliche Kinasen deren Funktion hinsichtlich der Signalerkennung in der AM von Interesse sein könnte. Der bereits erwähnte, bei weitem am häufigsten auftauchende Klon (SP12) zeigte Homologien zu einem pflanzlichen Extensin.

5 Ergebnisse

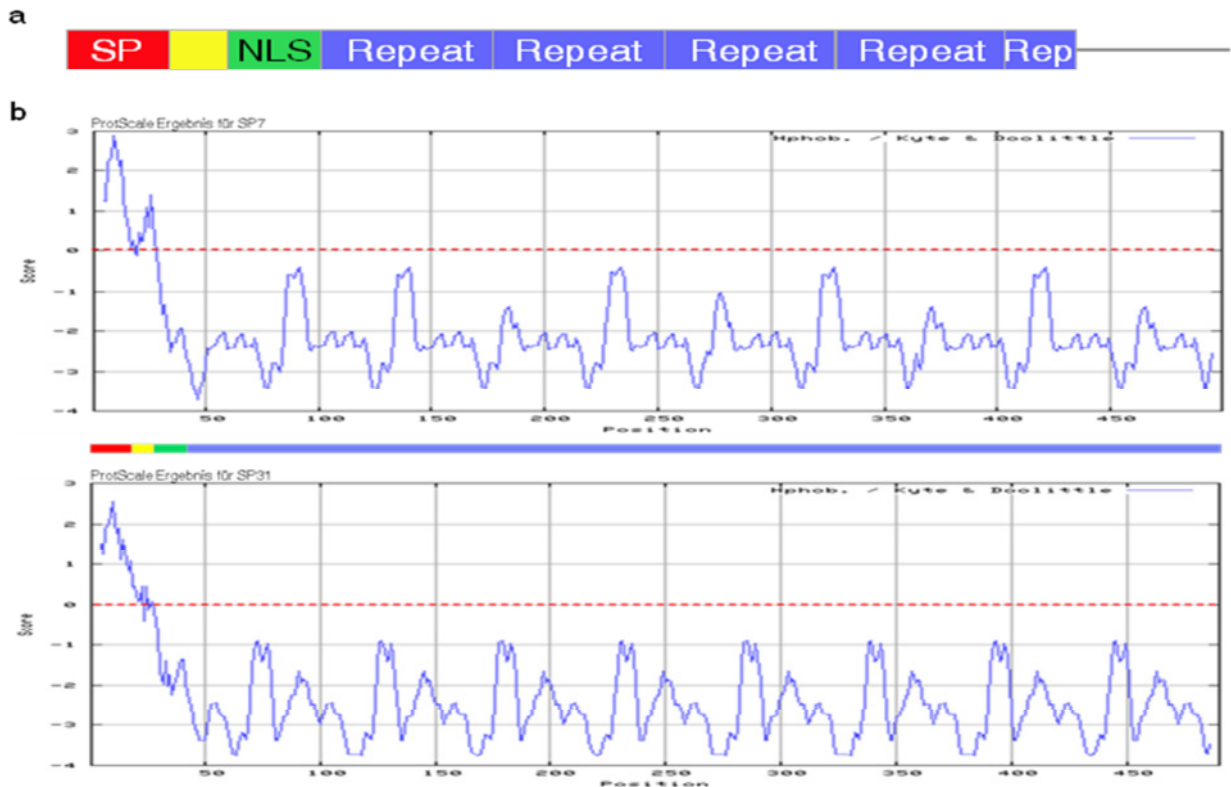
Für eine Vielzahl von Klonen konnten keine bisher bekannten Homologe gefunden werden. Besonders zur besseren Analyse dieser Klone wurden alle Proteinsequenzen mittels bioinformatischer Analyseprogramme (Kapitel 4.7) auf das Vorhandensein von bekannten, konservierten Motiven hin untersucht. Hierbei konnten für die Klone SP7, SP14, SP31 und SP66 durch das Programm Motifscan die Präsenz eines Zellkernlokalisierungssignals (NLS) vorhergesagt werden. Diese Tatsache erscheint überaus interessant, da bei sekretierten pilzlichen Proteinen eine NLS nur sinnvoll erscheint sofern diese auf den Pflanzenzellkern abzielt. Im Pflanzlichen Zellkern läge es diesen Proteinen auf vielfältige Weise offen ihren Wirt zu manipulieren um z.B. eine Abwehrreaktion zu unterbinden. Das Auffinden eines NLS qualifiziert deshalb diese Proteine zu den ersten potentiellen Effektorproteinen eines AM-Pilzes.

5.1.2 Eine neue Familie sekretierter Proteine in der AM

Drei der YSST-Klone, die sich durch die bioinformatische Vorhersage eines NLS als Kandidaten für Effektor-Proteine hervor getan hatten, zeigen auch über den Rest der Proteinsequenz eine auffällig konservierte Domänen-Struktur (Abb. 5.2 a). Die Klone SP7, SP14 und SP31 beinhalten abgesehen von dem Signalpeptid und des NLS eine kurze Asp/Tyr/Lys-reiche Region bisher nicht beschriebenen Funktion und eine Serie von nicht-perfekten tandemartigen Wiederholungen (Repeats), die sich über den gesamten C-Terminus der Sequenzen erstrecken. Eine Analyse der Aminosäuren Zusammensetzung offenbarte den durchgehend hydrophilen Charakter dieser Repeats (Abb. 5.2 b).

Das Protein SP7 (Sekretiertes Protein 7) zeigte bei der BLASTp-Suche in der NCBI-Datenbank eine geringe Homologie (E-Wert $3e^{-26}$ bis $1e^{-06}$) zu verschiedenen repeatenthaltenden Proteinen. Unter diesen Homologen ist ein Protein von *Plasmodium* spp. (NCBI Gen-Bank XP_001613172), welches das Pathogen während der Phase der Wirts-Invasion produziert, sowie ein Protein (NCBI Gen-Bank AAA34563.), welches in Hefen unter Hitze-Schock und bei DNA-schädigenden Bedingungen exprimiert wird. Mit Ausnahme des S Antigens von *Plasmodium falciparum* (NCBI Gen-Bank AAA29761) enthielt aber keines der ermittelten homologen Proteine eine Signalsequenz zur Sekretion. Für die Proteine SP14 und SP31 konnten keine Proteine anderer Organismen mit einer signifikanten Homologie ermittelt werden. Jedoch weisen diese Proteine untereinander mit 87 % eine etrem hohe Identität auf. Die Identität zwischen SP7 und SP31 liegt bei 48% (Abb. 5.3).

Aufgrund der bisher genannten strukturellen Gemeinsamkeiten können die Proteine SP7, SP14 und SP31 zu einer neuartigen Proteinfamilie (SP7-Proteinfamilie) zusammengefasst werden. Für *G. intraradices* liegt bisher kein vollständig assembliertes Genom vor. Jedoch besteht eine Datenbank aus bereits sequenzierten Bereichen des Genoms, die eine BLAST-Suche ermöglicht. Durch Einsatz eines Repeats von SP7 als Suchanfrage, konnte ein weiteres Protein (c118621) identifiziert werden, welches alle Strukturmerkmale der SP7-Familie teilt und daher ihr zugerechnet werden kann. Aus mehreren in der Datenbank verfügbaren kurzen Teilstücken wurde eine chimäre Sequenz angefertigt und mit der SP-Familie aliniert (Abb. 5.3).



5.2 Domänenorganisation der SP7-Proteinfamilie

(a) Alle Proteine der SP7-Familie weisen einen gemeinsamen strukturellen Aufbau aus vier charakteristischen Domänen auf: Signalpeptid (SP, rot), eine konservierte Region bisher unbekannter Funktion (gelb), ein Kernlokalisierungssignal (NLS, grün) und eine Serie nicht-perfekter, tandemartiger Sequenzwiederholungen (Repeats, blau).

(b) ProtScale-Resultat für SP7 (oben) und SP31 (unten). Die Domänenverteilung ist mittig vereinfacht dargestellt (Farben wie bei (a)). Die Analyse der Aminosäuren der beiden Proteine dokumentiert die starke Hydrophilie der Repeats. (Score >0 hydrophob; Score <0 hydrophil).

SP7	1	MKFTTLACLA	LGISTLNEVNAAP	IAEIG	--LNNKRD	STPSYDK	KKDK	KDDYYGGK	DDEY	YGSKD	65	
SP14	1	MKFTTLVCLT	ALGVSA	LN-VNAAP	--I	SEVELNNKRD	-APSTYC	YDDDKKDK	----	YDDEY	54	
SP31	1	MKFTTLVCLT	ALGVSA	LN-VNAAPT	PI	SDVELNNKRD	-APSTYYY	YDDDKKDK	----	YDDEY	56	
c118621	1	MKLTIAICLA	ILGVSTLNEV	TAAPT	PNTGI	ELNDKRDE	SPSSYYY	YDDKKK	ED----	KDDYY	58	
SP7	66	DDYYGGKDDK	YDDDKKSSYRR	-----	SALASPGD	KDDDYGGK	DDYYGGK	KDDDYGGK	KDD	122		
SP14	55	-----	YDDKKK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	61		
SP31	57	-----	YDDKKK	DDKKEKYR	NAVANEKDY	KDEKDSY	DSYPDSY	DGKDKY	DDEYGY	DDK	113	
c118621	59	-YYYD----	YKKGKKEHSYK	-----	-----	NDKDD-	YYK-----	-----	-----	KDD	84	
SP7	123	KYDDDKK	KS	GYRRS	ALASPGD	KDDDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	189
SP14	62	-HKDDK	KDKYRR	SAVA	EEDK-----	YKDEK	DSYDYP	DSYDG-----	-----	-----	98	
SP31	114	KKKDDK	KKEKYR	SAVANEK	D-----	YKDEK	DSYDYP	DSYDG-----	-----	-----	151	
c118621	85	HKDKDK	--YRR	NALASPGD	-----	THND	YY--	KEDDY	KN-----	-----	117	
SP7	190	KDDDYGGK	DDYGGK	KDDDYGGK	KDDKY-----	-----	-----	-----	-----	-----	218	
SP14	99	--KDKY	DDEY	G-----	YDDKKK	DHKD-----	-----	-----	-----	-----	117	
SP31	152	--KDKY	DDEY	G-----	YDDKKK	DKKKEKYR	RS	SAVADEKDY	KDEKDSY	DSYPDSY	DGKDKY	211
c118621	118	---EYY	EKDD----	HKDDYH	KEK-----	-----	-----	-----	-----	-----	135	
SP7	219	-----	DDDKK	SSYKRS	ALASPGD	KDD--	DYGGK	DDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	DDYGGK	270
SP14	118	-----	DKKE	KYRR	SAVTEEKDY	KDEKDSY	DSYD	SPHSYD	GKGYD	DEYGYDK	-----	163
SP31	212	GYDDK	KDKKDK	KKEKYR	SAVADEKDY	KDEKDSY	DSYPDSY	DGKDKY	DDEYGY	DDK	KDKK	276
c118621		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

5.3 Alignment der SP7 Proteinfamilie

ClustalW Alignment der Aminosäuren Sequenz der Proteine SP7, SP31, SP14 (wie isoliert aus der cDNA-Bank „induziert“) und c118621 Signalpeptid, die unbekannte, konservierte Region und das NLS sind in den Farben Rot, Gelb und Grün angedeutet.

5.2 Charakterisierung des putativen Effektorproteins SP7

5.2.1 Entwicklungsstadien abhängiges Auftreten verschiedener SP7-Populationen

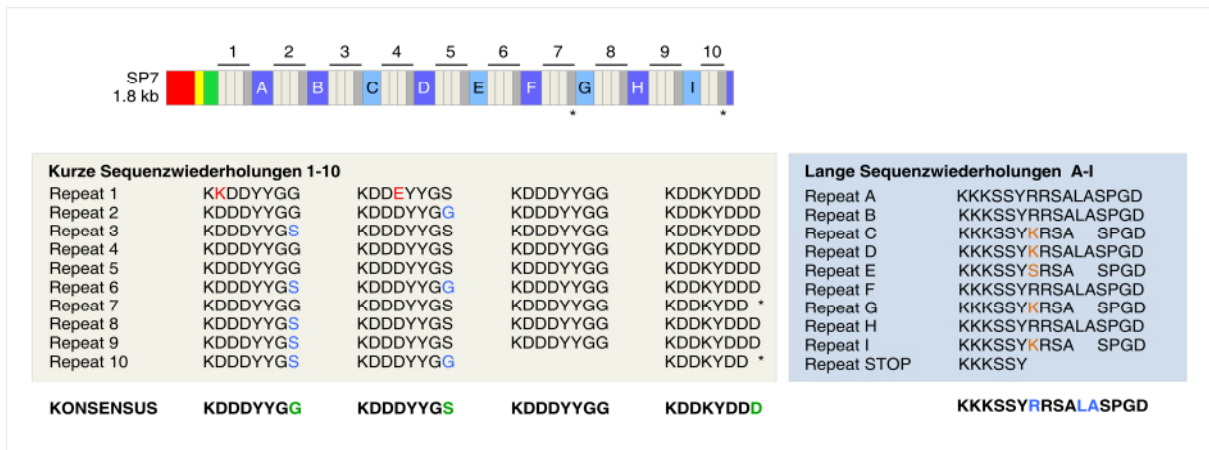
Aufgrund seiner außergewöhnlichen Repeatstruktur, die im Folgenden dargestellt werden soll, wurde das familienbegründende Protein SP7 für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Bedingt durch die für die YSST-Methode notwendige cDNA-Synthese mit Hexamer-Primern, endete die bisher längste isolierte Version inmitten des 5. Repeats. Mit Hilfe einer 3'RACE-PCR konnte der 3'UTR Bereich des SP7 Proteins amplifiziert werden. Erstaunlicherweise endete die so gewonnene cDNA-Sequenz bereits im 4. Repeat mit dem Stopp-Codon.

Erst die durch die RACE-PCR gewonnene Kenntnis über die 3'UTR Sequenz von *SP7* ermöglichte die Amplifikation des vollständigen transkribierten Bereichs aus gDNA von *G. intraradices*, da alle zuvor getesteten Primer aufgrund der ausgeprägten Repeat-Struktur mehrfach in der Sequenz binden konnten. Der Einsatz von Primern in der 5'UTR und 3'UTR von *SP7* für eine PCR auf gDNA des Pilzes führte zu einem einzigen Amplikon mit der Länge von ca. 1,8 kb. Die verschiedenlangen Versionen von *SP7* müssen somit auf eine einzelne Kopie des Gens im Genom von *G. intraradices* zurückzuführen sein.

Die Sequenzanalyse des aus gDNA amplifizierten Fragmentes von *SP7* legte ein einzelnes konventionelles Intron von 68 bp im Bereich des Signalpeptides offen. Die längste mögliche cDNA, die sich aus dieser Sequenz ableiten lässt, besitzt eine Länge von ca. 1,8 kb und umfasst 9 vollständige und einen nicht ganz kompletten, letzten Repeat.

Durch aminosäuregenaue Analyse der einzelnen Repeats konnte deren Feinaufbau aufgeschlüsselt werden (Abb. 5.4). Ein Repeat setzt sich aus vier kurzen Sequenzwiederholungen (je 8 AS), sowie einer längeren (je 14 oder 16 AS) zusammen. Die dritte kurze Sequenzwiederholung scheint hierbei die am höchsten konservierte zu sein und entspricht in jedem Repeat der Aminosäurefolge KDDYYGG. Die erste und zweite kurze Sequenzwiederholung eines jeden Repeats, ähneln dieser Sequenz bis auf wenige Ausnahmen stark, variieren nur in den letzten beiden Aminosäuren zwischen GG und GS. Die vierte kurze Sequenzwiederholung weicht in ihrer Sequenz KDDKYDDD etwas von der ersten drei ab, ist aber über das ganze Protein hinweg konserviert. Ausnahmen finden sich nur in den Repeats 7 und 10, in welchen jeweils die achte Aminosäure fehlt.

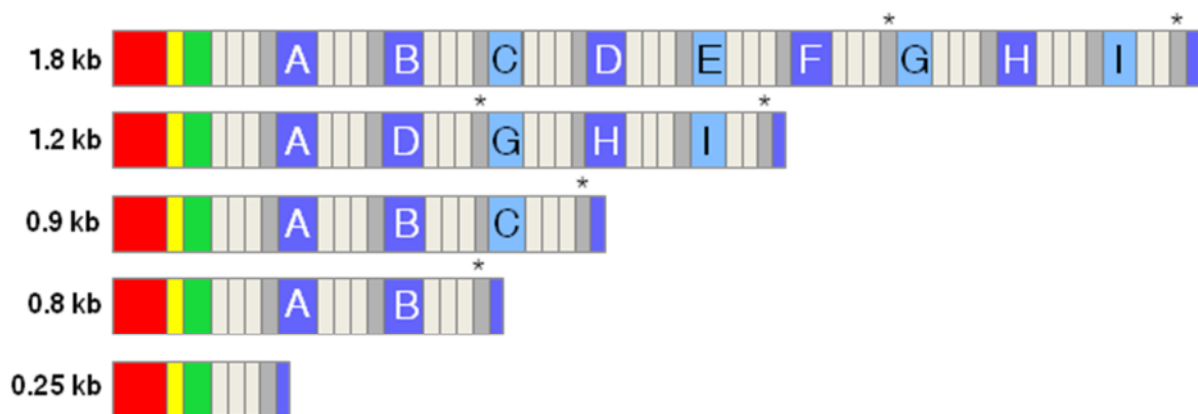
Bei den langen Sequenzwiederholungen finden sich zwei Variationen (14 oder 16 AS lang) die abgesehen von Sequenzfolge A und B stets abwechselnd nach 4 kurzen Sequenzwiederholungen auftreten.



5.4 Detaillierte Repeatsstruktur und Sequenz des Proteins SP7

Die der gDNA abgeleitete Aminosäuresequenz von SP7 besteht aus 10 Repeats, von denen der letzte vorzeitig mit dem Stopp-Codon endet. Jeder Repeat kann weiter in vier kurze und eine lange Sequenzwiederholung unterteilt werden. Die kurzen Sequenzwiederholungen (7 oder 8 AS) weisen sehr ähnliche Sequenzen auf (grau). Die langen Sequenzwiederholungen bestehen entweder aus 14 AS (hellblau) oder 16 AS (dunkelblau). Die dünnen, schwarzen Balken deuten die vier kurzen Sequenzwiederholungen an, deren Sequenzen in der grauen Box einzusehen sind. Die Sternchen markieren die kurzen Sequenzwiederholungen aus 7 AS. Die langen Sequenzwiederholungen sind mit Buchstaben in der schematischen Darstellung hervorgehoben und ihre Sequenzen sind in der blauen Box aufgelistet. Abweichungen zur Konsensus-Sequenz wurden jeweils farblich markiert. Farblich hervorgehobene Proteindomänen: SP (rot), unbekannte konservierte Region (gelb), NLS (grün), kurze Sequenzwiederholungen (grau) und lange Sequenzwiederholungen (blau).

Die mittels RACE-PCR detektierte cDNA-Version von SP7 (0,8 kb) könnte aus dieser theoretischen maximalen cDNA-Version durch alternatives Spleißen mit unkonventionellen Spleißstellen nach dem *Exon-Skipping* Mechanismus gewonnen werden. Diese Vermutung wurde weiter bestärkt durch die Entdeckung, dass beim Einsatz des SP7 5'UTR /3'UTR Primer-Paares in cDNAs aus verschiedenen Entwicklungsstadien der AM-Symbiose unterschiedliche Bandenmuster bei einer PCR-Reaktion detektiert wurden. Einige dieser Banden konnten isoliert und sequenziert werden. Die ermittelten Sequenzen wurden Base für Base mit der genomischen Version abgeglichen und so für jede Population die individuelle Abfolge der kurzen und langen Sequenzwiederholungen der Repeats ermittelt (Abb. 5.5). Die verschiedenen Versionen von SP7 (genomisch und cDNA) wurden bei der NCBI Datenbank mit den folgenden Zugangsnummern hinterlegt: HM998614, HM998615, HM998616 und HM998617.

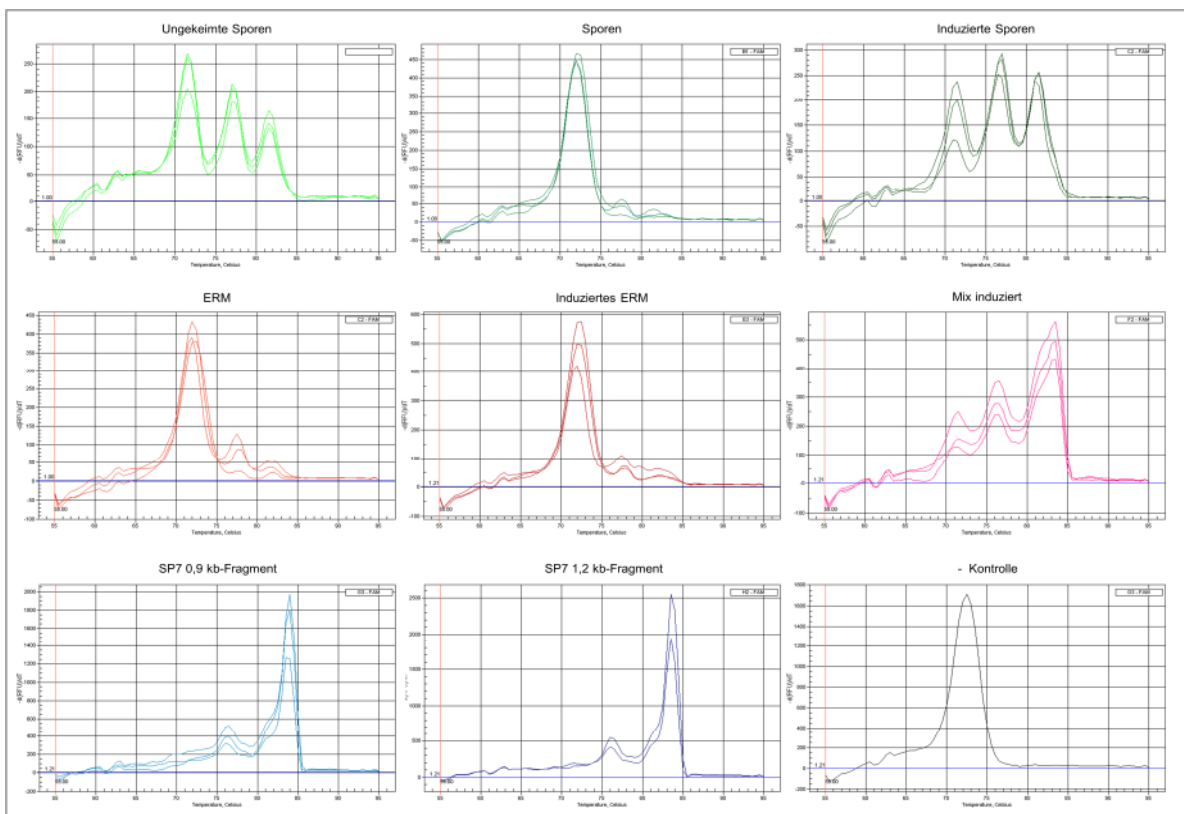


5.5 Repeatororganisation verschiedener SP7-Populationen

Repeatororganisation verschiedener SP7-Populationen. Sternchen markieren die kurzen Sequenzwiederholungen mit nur 7 AS. Gleiche Farben stehen für Domänen/Repeat-Untereinheiten mit ähnlichen Sequenzen. Farblich hervorgehobenen Proteindomänen: SP (rot), unbekannte konservierte Region (gelb), NLS (grün), kurze Sequenzwiederholungen (grau) und lange Sequenzwiederholungen (blau).

5 Ergebnisse

Um zu untersuchen ob unterschiedlich lange Transkripte von *SP7* in verschiedenen Entwicklungsstadien dominant sind, wurde nach einer PCR mit dem UTR-Primerpaar auf cDNAs verschiedener Entwicklungsstadien, eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte vorgenommen. Wie (Abb. 5.6) zeigt scheinen in gekeimten Sporen (Sporen), extraradikalem Myzel (ERM) und in ERM, welches mit Pflanzen in Kontakt stand (induziertes ERM), je eine cDNA-Population die vorherrschende zu sein. Hierbei muss aber beachtet werden, dass dieser Peak auch in der Negativkontrolle ohne Template auftritt und sich dort nur als Primer-Dimere erklären lässt. Er könnte also auch in den Proben Sporen, ERM und induziertes ERM auf Primer-Dimere zurückzuführen sein. In ungekeimten Sporen und Sporen die mit Pflanzen inkubiert wurden (induzierte Sporen) hingegen sind deutlich mehrere Peaks bei der Schmelzkurvenanalyse ersichtlich. Dies deutet auf verschiedene *SP7*-Populationen hin, die zeitgleich in diesen Entwicklungsstadien produziert werden. Für die cDNA „Mix induziert“ wurde das gleiche Material eingesetzt wie in der cDNA-Bank „induziert“, welche für den YSST verwendet wurde. Die cDNA enthält sowohl induzierte Sporen, als auch induziertes ERM und somit auch alle in diesen Stadien vorkommenden Populationen.



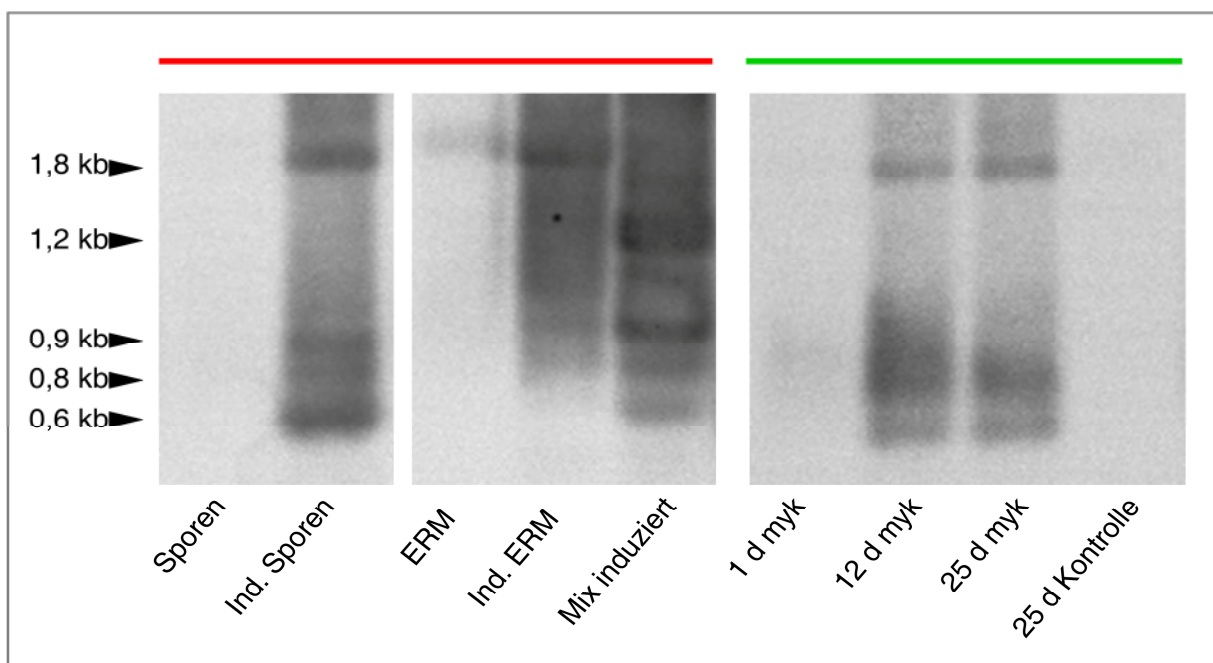
5.6 Graphische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse zur Detektion verschiedener *SP7*-Populationen

Zur Untersuchung der Verteilung der verschiedenen *SP7*-Populationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der AM-Symbiose, wurde *SP7* aus cDNA verschiedener prä-symbiotischer als auch symbiotischer Stadien amplifiziert. Die verwendeten Primer führten zu Amplikons in allen denkbaren Populationen. Jedes PCR-Produkt resultiert theoretisch in einem spezifischen Peak der Schmelzkurve, so dass die Anzahl der Peaks Rückschlüsse auf die Zahl der verschiedenen Populationen zulassen sollte. Ein Graph zeigt drei technische Replikate der gleichen cDNA. Zur Kontrolle wurden bereits bekannte *SP7*-Populationen aus dem TOPO-Vektor amplifiziert (*SP7* 0,9 kb bzw. 1,2 kb Fragment) als auch ein Probe ohne Template (- Kontrolle) getestet.

Anhand der Schmelzkurvenanalyse lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen, um welche Populationen es sich in den jeweiligen Stadien handelt. Dies geht aus den Schmelzkur-

ven der 0,8 kb und 1,2 kb SP7-Populationen hervor, die als Referenzen eingesetzt wurden, aber beide den Peak bei gleicher Schmelztemperatur zeigten. Die Länge der Populationen scheint somit nur bis zu einem gewissen Grad von Bedeutung zu sein bzw. scheint die Schmelzkurvenanalyse nur eine begrenzte Auflösung bei der Unterscheidung verschiedener Populationen zu bieten. Nichtsdestotrotz deutet die Schmelzkurvenanalyse tatsächlich auf verschiedene Kombinationen der SP7-Populationen während verschiedener Phasen der Symbiose hin.

Um weiter Aufschluss darüber zu erhalten zu welchem Zeitpunkt der Symbiose die verschiedenen gespleißten Populationen anzutreffen sind, wurden eine Southern Blot Analyse der PCR Produkte durchgeführt. Hierzu wurden die mit den UTR-Primerpaar aus cDNAs verschiedener Entwicklungsstadien amplifizierten Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt, gebロットet und mit der DIG-markierten 0,9 kb SP7-Population als Sonde detektiert. Wie aus Abb. 5.6 und aus Abb.5.7 hervorgeht, wird in den nicht mit Pflanzen in Kontakt stehenden Sporen und dem ERM, im Vergleich zu den selben induzierten Proben, SP7 nur in geringen Mengen produziert. Die 1,8 kb Population ist in allen induzierten Proben präsent. In den induzierten Sporen scheinen aber im Vergleich mit dem induzierten ERM zusätzlich auch kürzere Populationen eine Rolle zu spielen. Die Probe „Mix induziert“ zeigt deutlich, dass während der LD-Amplifikation einige Populationen verstärkt amplifiziert wurden und erklärt so auch das gehäufte Auftreten der 1,2 kb-Version im YSST, die unter natürlichen Bedingungen eher selten vorzukommen scheint. Die LD-PCR führte somit, im Kontrast zu den Angaben des SMART-Kits, doch zu einer leichten Verschiebung der natürlichen Verteilung der cDNAs.



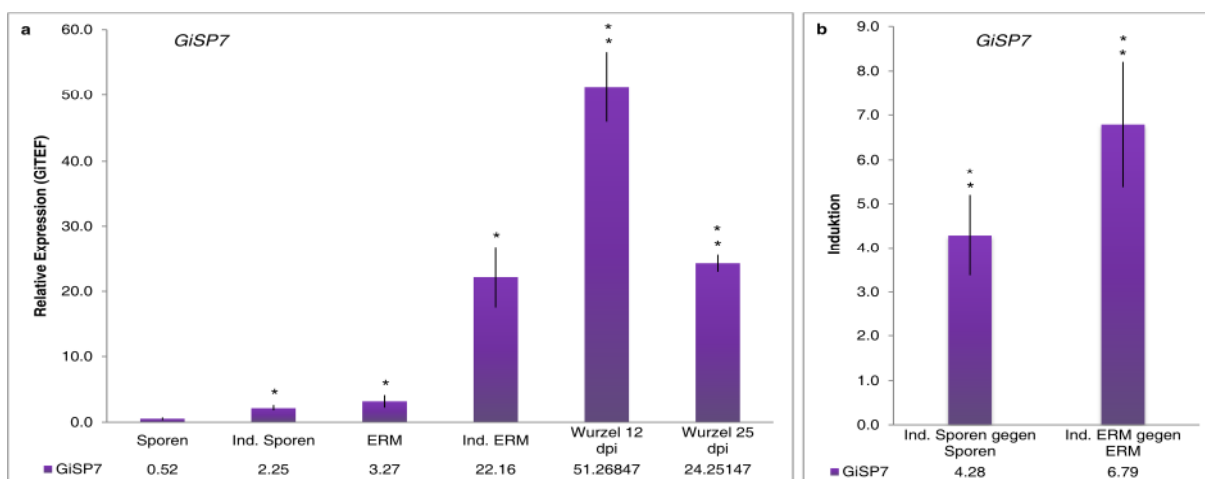
5.7 Analyse der SP7-Populationen zu verschiedenen Entwicklungsstadien der Symbiose

Diverse SP7-Populationen wurden aus der gesamt cDNA verschiedener prä-symbiotischer als auch symbiotischer Stadien der AM amplifiziert. Die Populationen wurden gebロットet und unter Verwendung der SP7-Population 0,9 kb als Repeat-bindende Sonde detektiert. cDNA: gekeimte Sporen (Sporen), Sporen mit Pflanzenkontakt (Ind. Sporen), Extraradikales Mycel (ERM), ERM inkubiert mit Wurzeln (Ind. ERM), LD-amplifizierte cDNA verschiedener Stadien mit Pflanzenkontakt (Mix induziert), 1-25 d mykorrhizierte Wurzeln von *M. truncatula* (1-25 d myk) sowie eine nicht mykorrhizierte Kontrollwurzel (25 d Kontrolle). Roter Balken: cDNA pilzlichen Ursprungs, grüner Balken: cDNA aus *in planta* Stadien der Symbiose.

5 Ergebnisse

Besonderes Interesse bestand auch darin zu erfahren welche der SP7-Populationen die dominante Version *in planta* ist. Hierzu wurden cDNAs von 1 d, 12 d und 25 d mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln auf gleiche Weise wie die anderen Entwicklungsstadien untersucht. Hierbei zeigte sich eine Akkumulation von SP7 erst bei fortgeschrittener Mykorrhizierung der Wurzeln. Die vorherrschend in der Pflanze aktive Splice-Version von SP7 scheint wiederum die 1,8 kb-Population zu sein.

Zur genauen Quantifizierung der *SP7*-Transkript Akkumulation wurden die Primer SP7-qPCR-F2 und SP7-qPCR-R2 in einer Real-Time-RT-PCR eingesetzt (Abb. 5.8). Die Primer binden beide in der 3'UTR von *SP7* und führen somit in allen Populationen von SP7 zum gleichen Amplikon. Eine Differenzierung zwischen den einzelnen Populationen ist dadurch allerdings nicht möglich. Die real-time PCR bestätigte die Ergebnisse der Southern Blot Analyse und zeigte eine RNA-Akkumulation in den Entwicklungsstadien, die mit der Pflanze in Kontakt standen. In der Pflanze zeigt sich eine höhere Expression von *SP7* nach 12 d der Mykorrhizierung als nach 25 d.



5.8 Transkript-Akkumulation von SP7 in pilzlichen Geweben und infizierten Wurzeln

(a) Expression von *SP7* relativ zu *GiTEF*. Gezeigt werden die Expressionsdaten von gekeimten Sporen und extraradikalem Myzel (ERM) jeweils nicht-induziert und induziert durch Ko-Inkubation mit Wurzeln, sowie aus mykorrhizierten Wurzeln 12 und 25 Tage nach der Infektion (dpi). Der t-test wurde mit der Expression in Sporen als Vergleichsgröße durchgeführt.

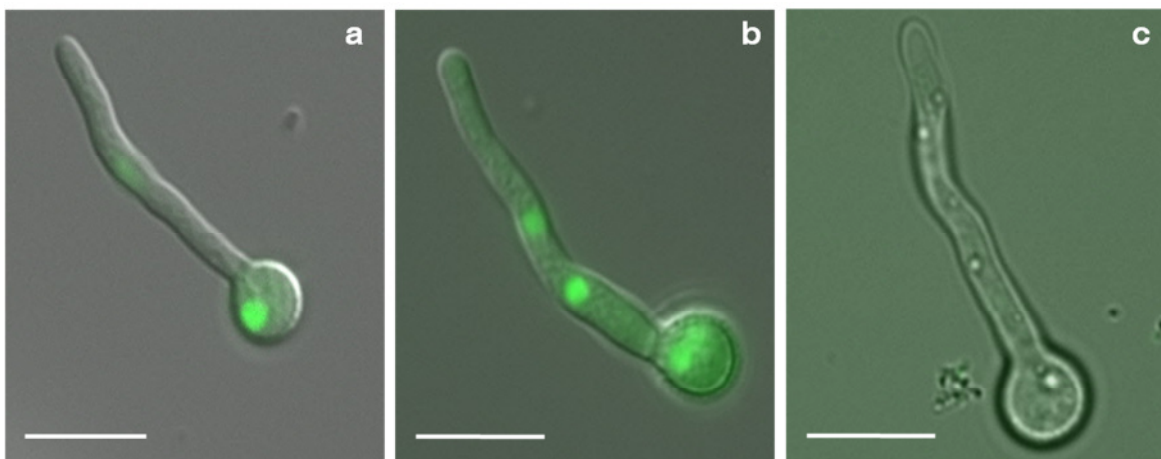
(b) Expressionsinduktion in den induzierten Proben gegenüber den nicht induzierten Proben der gleichen pilzlichen Gewebe

Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten dar (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für eine Bedeutung von SP7 zu allen Phasen der Symbiose, in der Pilz und Pflanze miteinander in Kontakt stehen und Kommunikation der beiden Partner erforderlich ist. Besonders in der frühen *in planta* Phase scheint das Protein wichtig zu sein und könnte somit eine entscheidende Funktion in der Etablierung der AM-Symbiose einnehmen.

5.2.2 SP7 tritt in die Pflanzen Zelle ein und lokalisiert im Nukleus

Zur Validierung von SP7 als ernst zu nehmenden Kandidaten für ein Effektorprotein wurde zunächst die Funktionalität des bioinformatisch vorhergesagten NLS überprüft. Da zurzeit noch kein System zur stabilen Transformation von *G. intraradices* existiert wurde SP7 ohne Signalpeptid (SP7 Δ SP) fusioniert an GFP in dem Ascomyceten *Aspergillus nidulans* exprimiert. *A. nidulans* ist ein ebenfalls filamentös wachsender Pilz mit einem in unserem Labor gut etablierten Transformationsprotokoll. Die Expression von SP7 Δ SP-GFP erfolgte unter der Kontrolle des induzierbaren *alcA*-Promotors in dem *A. nidulans* Stamm RMSO11. Zur Untersuchung der Lokalisation wurden gekeimte Konidiosporen in unterschiedlichen Medien unter dem Epifluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 5.9). Tatsächlich konnte unter de-reprimierten Bedingungen in glycerolhaltigem Medium eine eindeutige Lokalisation des Proteins in den Pilz-Zellkernen nachgewiesen werden. In Medium mit Threonin als C-Quelle, welches zu einer Induktion des Promotors führt, war das Fusionsprotein deutlich in den Zellkernen des Pilzes sowie etwas im Zytoplasma sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Fluoreszenzsignal, wenn die Expression von SP7 Δ SP-GFP in glukosehaltigem Medium reprimiert wurde.

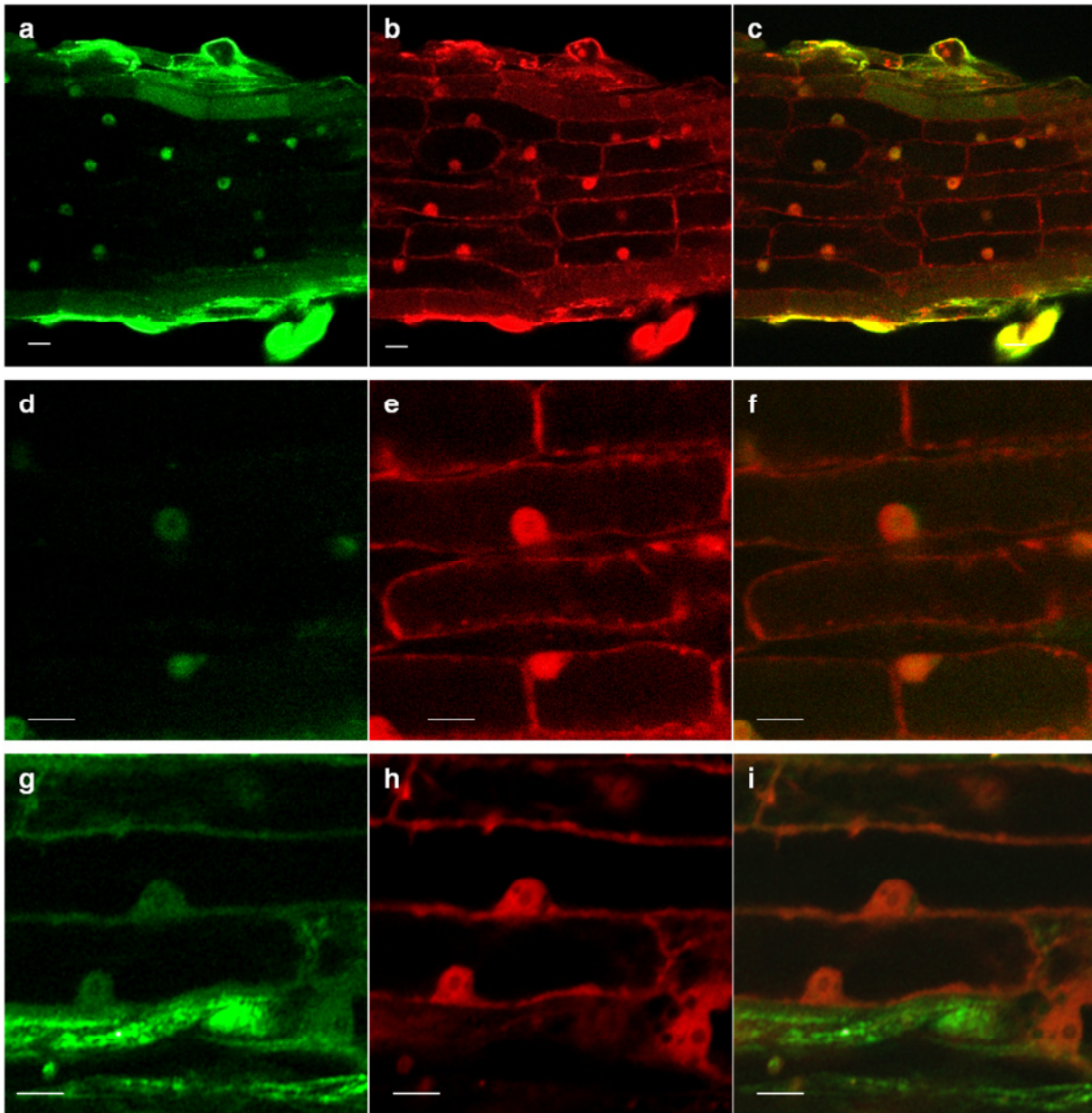


5.9 SP7 ohne Signalpeptid lokalisiert im Zellkern von *Aspergillus nidulans*

(a,b) Nukleäre Lokalisation von SP7 ohne Signalpeptid (SP7 Δ SP) fusioniert mit GFP in gekeimten Konidiosporen von *Aspergillus nidulans* bei De-Repression (Glycerol, a) und Induktion (Threonin, b) des *alcA*-Promotors. (c) Unter reprimierten Bedingungen in glukosehaltigem Medium ist keine grüne Fluoreszenz zu erkennen. Bei den Bildern handelt es sich um epifluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen. Gezeigt wird jeweils eine Überlagerung des Hellfeld- und des GFP-Kanals. Die Größenbalken repräsentieren 10 μ m.

Um zu testen ob SP7 auch *in planta* im Zellkern lokalisiert, wurden die stabile Transformation von *Medicago truncatula* Wurzeln, sowie die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. In *M. truncatula* wurden sowohl SP7 als auch SP7 Δ SP unter der Kontrolle des 35S Blumenkohl-Mosaik-Virus (BMV) Promotors fusioniert an GFP exprimiert.

5 Ergebnisse



5.10 SP7 lokalisiert im Zellkern von *M. truncatula*

Konfokalmikroskopische Einzelebene-Aufnahme von SP7-GFP (mit oder ohne Signalpeptid von SP7) exprimierenden *M. truncatula hairy root* Linien.

(a,d) Das Fusionsprotein SP7-GFP lokalisiert im Zellkern der Wurzel-Kortezellen.

(b,e) Das Protein DsRed1, welches zur Kontrolle konstitutiv in den gleichen Wurzeln exprimiert wird, lokalisiert im Zellkern und im Zytoplasma.

(c,f) Überlagerung von (a) und (b) bzw. (d) und (e).

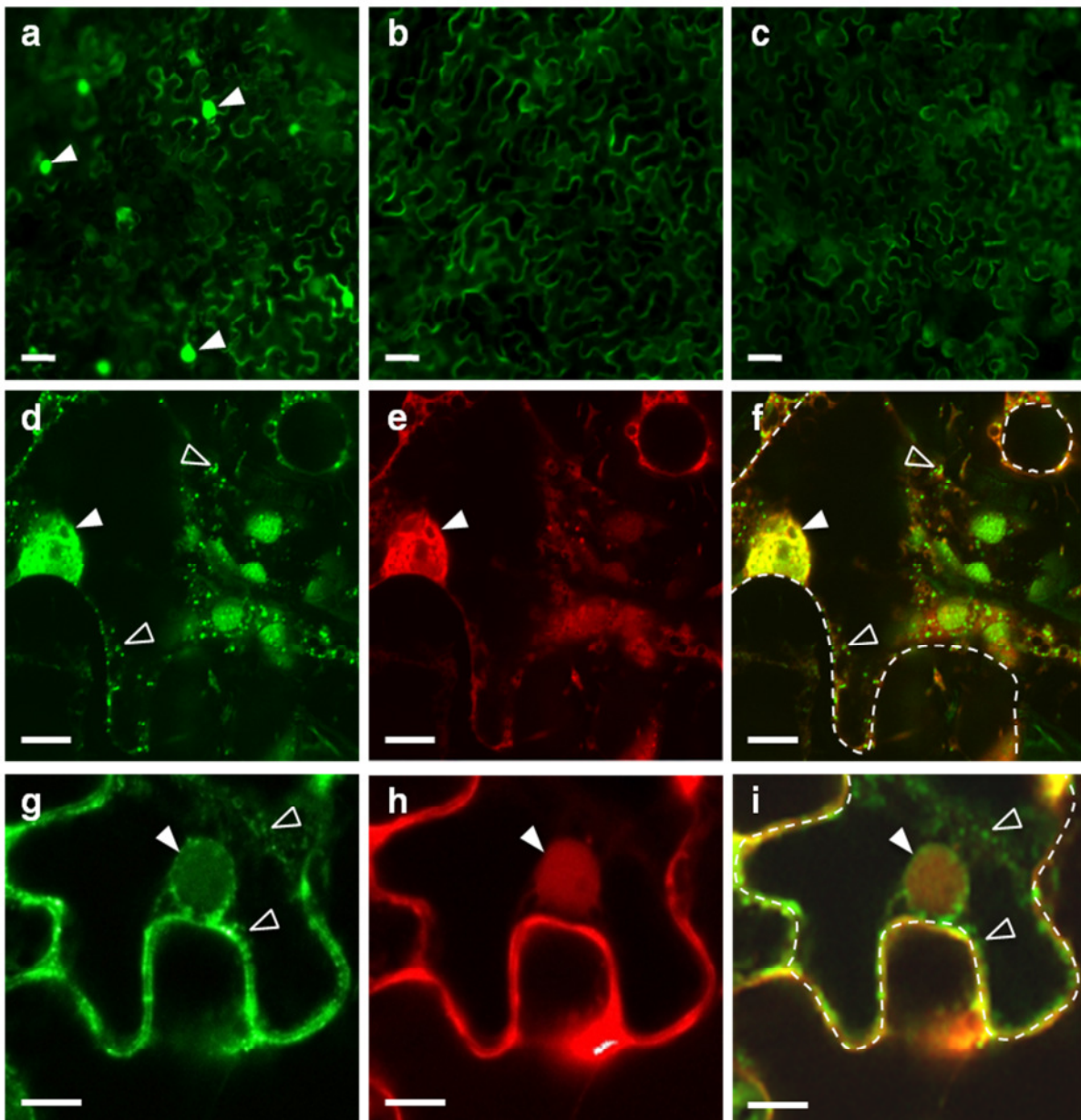
(g) Expression von SP7 ohne Signalpeptid fusioniert an GFP (SP7ΔSP-GFP). Das Fusionsprotein zeigt keine spezifische Lokalisation innerhalb der Zelle. Es ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektierbar und gleicht somit fast vollständig der Lokalisation des Kontrollproteins DsRed1 (h).

(i) Die Überlagerung von (g) und (h) zeigt die nahezu vollständige Kolo-kalisation von SP7ΔSP-GFP und DsRed1. Das GFP-Fusionsprotein ist jedoch zusätzlich in Vesikeln zu detektieren.

Hierzu wurden mittels *Agrobacterium rhizogenes* vermittelter Transformation *hairy roots* generiert, die neben den SP7-Fusionsproteinen konstitutiv DsRed1 exprimieren. Die Analyse der Wurzeln unter dem Konfokalmikroskop zeigte eine exklusive Lokalisation von SP7-GFP in den Zellkernen der Wurzelzellen (Abb. 5.10 a+d). Im Kontrast dazu findet sich das DsRed1 Kontroll-Protein nicht nur in den Zellkernen, sondern auch im Zytoplasma eben dieser Pflanzenzellen (Abb. 5.10 b+e). Die Untersuchung der SP7 Δ SP-GFP exprimierenden *M. truncatula* Wurzeln zeigte kein derartig eindeutiges Ergebnis. Generell war in allen untersuchten Linien nur ein relativ schwaches Fluoreszenzsignal zu detektieren. Dieses konnte allerdings, vergleichbar zur DsRed1-Kontrolle, sowohl im gesamten Zytoplasma, als auch im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 5.10 g+h). Zusätzlich zeigte sich in der Überlagerung der beiden Fluoreszenzaufnahmen, dass SP7 Δ SP-GFP auch in kleinen Vakuolen lokalisiert, die keine rote Fluoreszenz durch DsRed1 aufweisen (Abb. 5.10 i).

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* wurde durch Infiltration von *Agrobacterium tumefaciens* in die Blätter der Tabakpflanzen bewerkstelligt. Die Expression von SP7-GFP lässt sich nach 3-5 Tagen, also wesentlich schneller als in den *M. truncatula* Wurzeln (ca. 4 Wochen) observieren. Zudem bietet das dünne Blattgewebe eine bessere Auflösung für mikroskopische Untersuchungen, als die relativ dicken Wurzeln. Zusätzlich zu den Konstrukten zur Validierung der Resultate der *M. truncatula* Expressions Experimente wurden in die Tabakpflanzen Kontrollkonstrukte transformiert, die die Funktionalität des pilzlichen Signalpeptids in der Pflanze überprüfen sollten (Abb. 5.11). Wie schon in den *M. truncatula* Wurzeln zeigte sich die Fluoreszenz des SP7-GFP Fusionsproteins deutlich in den Zellkernen der puzzelteilmförmigen Tabak-Epidermiszellen (Abb. 5.11 a,d). Außerdem konnten sehr kleine Vesikel, gefüllt mit dem GFP-getaggten SP7, detektiert werden, die keine Kolo-kalisation mit der DsRed1 Kontrolle zeigten (Abb. 5.11 e,f). Die Funktionalität der Signalsequenz von SP7 wurde getestet durch die Expression des Signalpeptids fusioniert zu GFP (SP_(SP7)-GFP) in dem gleichen Vektorkonstrukt, welches auch für alle vorangegangenen *in planta*-Expressions Experimente genutzt wurde (Abb. 5.11 b,g). Bei Expression des SP_(SP7)-GFP-Konstruktes ließen sich diese putativen sekretorischen Vesikel ebenso nur im GFP-Kanal detektieren, nicht aber bei der DsRed1-Kontrolle (Abb. 5.11 g,h). Im klaren Kontrast zur SP7-GFP Expression war bei diesem Konstrukt allerdings kein GFP-Signal im Zellkern zu erkennen. In Abb. 5.11 g,i ist deutlich zu erkennen, dass das Fusionsprotein nur im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums um den Zellkern herum akkumulierte. Als weitere Kontrolle wurde auch noch das Signalpeptid des pflanzlichen PR1-Protein (*pathogenesis related protein 1*) fusioniert an GFP (SP_(PR1)-GFP) in den *N. benthamiana* Blättern exprimiert welches das gleiche Lokalisations-Muster wie SP_(SP7)-GFP (Abb. 5.11 c) zeigte.

5 Ergebnisse



5.11 Sekretion und Translokation von SP7 in *Nicotiana benthamiana*

Mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen, transformierten *N. benthamiana* Blättern. Die Auswertung der Blätter erfolgte drei Tage nach der Infiltration mit *Agrobacterium tumefaciens*.

(a-c) Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Die Blätter exprimierten entweder SP7-GFP (a), nur das Signalpeptid von SP7 fusioniert an GFP (b, SP_(Sp7)-GFP) oder das Signalpeptid des PR1 Proteins fusioniert mit GFP (SP_(PR1)-GFP). Eine grüne Fluoreszenz im Zellkern ist nur bei Expression von SP7-GFP zu erkennen.

(d) Aufnahme einer Einzelsebene von (a) unter dem Konfokalmikroskop. SP7-GFP ist in den Zellkernen der Epidermiszellen, sowie in kleinen Vesikeln und in räumlicher Nähe zur Plasmamembran sichtbar.

(e) Die Fluoreszenz des Kontrollproteins DsRed1 ist in den gleichen Zellen wie in (d) nur im Zellkern und dem Zytoplasma sichtbar.

(f) Überlagerung von (d) und (e).

(g) Transiente Expression des Signalpeptids von SP7 fusioniert an GFP (SP_(Sp7)-GFP) in einem Blatt von *N. benthamiana*. Gezeigt wird eine Einzelsebene von (b) unter dem Konfokalmikroskop. Die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins SP_(Sp7)-GFP ist nun auch in kleinen Vesikeln und ER-ähnlichen Strukturen um den Zellkern zu erkennen.

(h) Das nicht sekretierte DsRed1-Protein lokalisiert im Zytoplasma und diffundiert in den Zellkern.

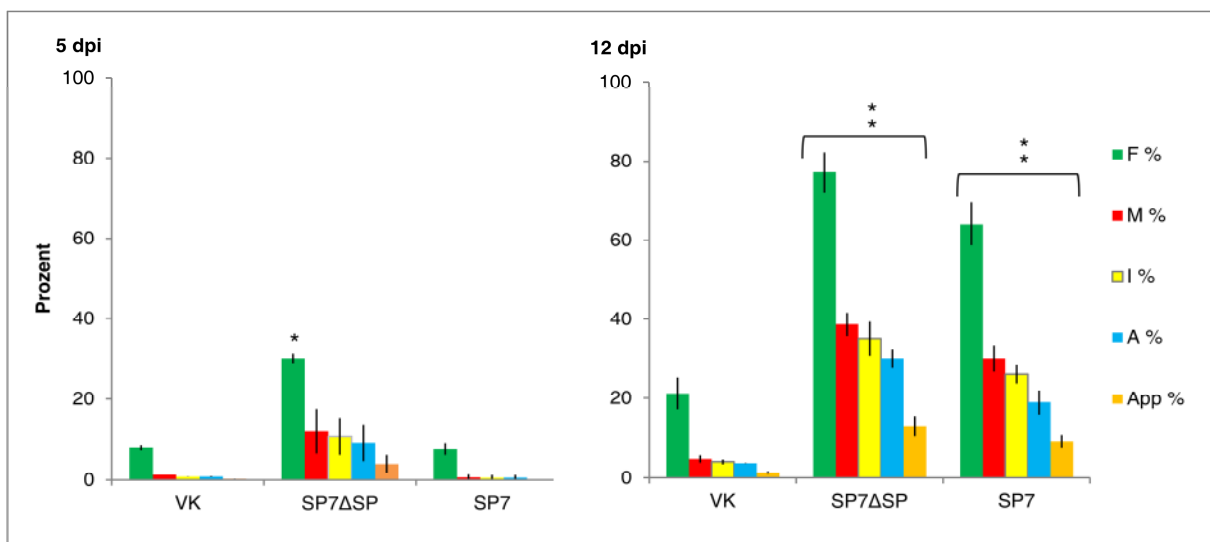
(i) Überlagerung von (g) und (h).

Die Größenbalken repräsentieren in a-c jeweils 50 µm in allen anderen Bildern je 10 µm. Gefüllte Pfeilköpfe weisen auf Zellkerne hin, ungefüllte Pfeilköpfe auf Beispiele für Vesikel. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der Plasmamembran.

5.2.3 Die konstitutive Expression von SP7 fördert die Ausbildung der AM-Symbiose

Um die Auswirkungen der konstitutiven Expression von SP7 in den *M. truncatula hairy roots* auf die Ausbildung der symbiotischen Interaktion mit *G. intraradices* zu untersuchen wurden Mykorrhizierungs-Experimente mit den transgenen Wurzellinien (Abschnitt 5.2.2) durchgeführt. Hierfür wurden die Wurzellinien die das vollständige SP7 oder SP7 ohne Signalpeptid (SP7 Δ SP) produzieren in dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Zweikompartimentensystem mit *G. intraradices* inokuliert. Zur Quantifizierung der Mykorrhizierung wurden nach 5 und 12 Tagen die Wurzeln von den Platten entnommen, gefärbt und entsprechend dem MYCO-CALC-System beurteilt. Als Referenz wurde eine transgene Wurzellinie (VK), transformiert mit dem gleichen Vektorkonstrukt jedoch ohne SP7-Expression, herangezogen und gleichermaßen behandelt. Zum Vergleich der Wurzeln wurden die Parameter F% (Frequenz/ Dichte der Mykorrhizierung im Wurzelsystem), M% (Intensität der Mykorrhizierung), A% (Abundanz der Arbuskeln), I% (Abundanz der intraradikalen Hyphen) und App% (Abundanz der Appressorien) verwendet.

Wie Abb. 5.12 zeigt, ließ sich bereits nach 5 Tagen bei der SP7 Δ SP-Linie eine in allen Parametern deutlich gesteigerte Mykorrhizierung im Vergleich zur Vektorkontrolle (VK) feststellen. Nach 12 Tagen konnten auch bei den SP7-exprimierenden Wurzeln eine signifikante Steigerung in allen Parametern im Vergleich zur Vektorkontrolle ermittelt werden. In den SP7 Δ SP-Wurzeln trat dieser Effekt sogar noch in gesteigerter Form auf.



5.12 Die Expression von SP7 führt zur verbesserten Ausbildung der AM-Symbiose

Beurteilung des Mykorrhizierungslevels von SP7 Δ SP-GFP und SP7-GFP *hairy root* Linien im Vergleich zur Vektorkontroll-Linie (VK) 5 bzw. 12 Tage nach der Inokulation (dpi). SP7 Δ SP-GFP und SP7-GFP Wurzellinien zeigten zu beiden Zeitpunkten eine weiter fortgeschrittene Mykorrhizierung als die Kontrollwurzeln. Die zur Bewertung hinzugezogenen Parameter sind: Frequenz (F%) und Intensität (M%) der Mykorrhizierung sowie Abundanz der intraradikalen Hyphen (I%), der Arbuskeln (A%) und der Appressorien (App%).

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate je einer repräsentativen Linie für jedes Konstrukt dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte aller Parameter der VK mit *p < 0.05 und **p < 0.01. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

5 Ergebnisse

Bei Vergleich der gefärbten pilzlichen Strukturen unter dem Mikroskop, konnte kein phänotypischer Unterschied zwischen den verschiedenen transgenen Wurzellinien festgestellt werden.

Diese Resultate deuten an, dass es sich bei SP7 tatsächlich um das erste beschriebene Effektorprotein eines AM-Pilzes handeln könnte. Unbeantwortet hingegen bleibt weiterhin ob SP7 alleine in der Lage ist diese Veränderungen des Mykorrhizierungsstatus der Pflanzenwurzeln hervorzurufen oder ob es dazu mit anderen pflanzlichen oder pilzlichen Proteinen interagieren muss.

5.2.4 SP7 interagiert mit dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor MtERF19 im Pflanzenzellkern

Zur Untersuchung möglicher pilzlicher sowie pflanzlicher Interaktionspartner von SP7, die zum Verständnis der Funktion von SP7 während der AM-Symbiose beitragen könnten, wurde eine Yeast two-Hybrid (Y2H) Analyse durchgeführt. Getestet wurde hierbei SP Δ SP7 gegen eine cDNA-Bank aus mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln (Diplomarbeit Torsten Klug, 2007). Nach dem erneuten Screen (Abb. 5.13 a) der beim Mating gewachsenen Kolonien, verblieben 80 Klone, aus denen die cDNAs von 14 verschiedenen Proteinen isoliert werden konnten. Mittels BLASTp-Suche konnten für alle Klone homologe Proteine identifiziert werden. Dabei handelte es sich ausschließlich um Proteine pflanzlichen Ursprungs. Typische falsch-positive Klone wurden eliminiert, so dass schlussendlich 9 potentielle Kandidaten verblieben (Tabelle 5-3).

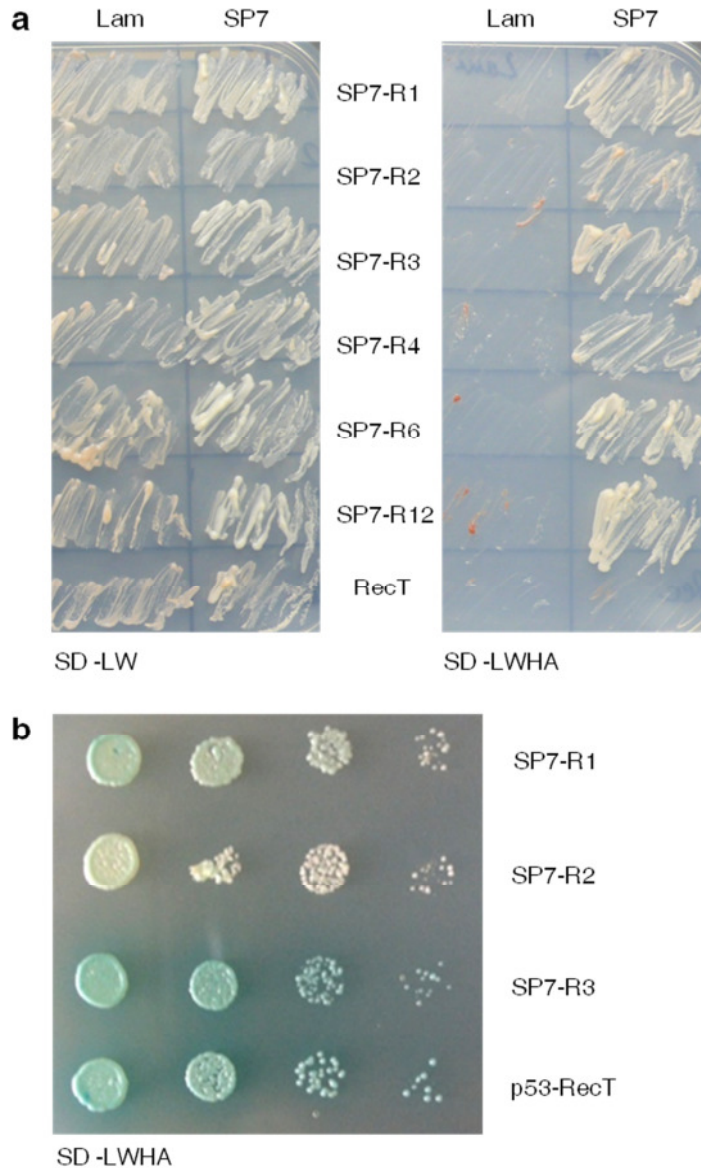
Tabelle 5-3 Mit SP7 interagierende Proteine isoliert im Y2H Screen

Der grau hervorgehobene Kon SP7-R3 zeigte die stärkste Interaktion mit SP7 und wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Klon	Homologie (Blastp NCBI)	E-Wert
SP7-R1	gb EEF48816.1 SR45 (Arginin/Serin-reich 45); RNA-bindend [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1,00e-08
SP7-R2	ref NP_199096.1 RNA-bindendes Region RNP-1; kleine Untereinheit des U2 Hilfsfaktors [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.5e-198
SP7-R3	dbj BAG50065.1 Transkriptionsfaktor AP2-EREBP [<i>Lotus japonicus</i>]	7,00e-45
SP7-R4	gb EEF34643.1 RING-H2 Finger Protein ATL2J, putativ [<i>Ricinus communis</i>]	0.063
SP7-R6	gb EEF48816.1 RNA-bindendes Protein S1, putativ [<i>Ricinus communis</i>]	3,00e-42
SP7-R15	ref XP_001780481.1 Prognostiziertes Protein [<i>Physcomitrella patens</i>]	2,00e-58
SP7-R19	ref XP_002312964.1 Pflanzen Synaptotagmin [<i>Populus trichocarpa</i>]	1.9
SP7-R33	gb ACJ85253.1 Unbekanntes Protein, Porin ähnlich [<i>Medicago truncatula</i>]	5,00e-148
SP7-R70	emb CAO42313.1 Nicht benanntes Protein Produkt: C2 domain [<i>Vitis vinifera</i>]	3,00e-37

Von diesen Klone stellten, aufgrund ihrer zu erwartenden zellulären Lokalisation, im Besonderen die Klone SP7-R1, SP7-R2, SP7-R3 und SP7-R6 verheißungsvolle Kandidaten für eine echte Interaktion dar. Drei Proteine (SP7-R1, SP7-R2, SP7-R6) zeigten die höchste Homologie zu RNA-bindenden Proteinen, die in alternatives Spleißen involviert sind. Bei Klon SP7-R3 handelte es sich um einen Transkriptionsfaktor der AP2-EREBP (APETALA2

and ethylene-responsive element binding proteins) Familie. Dieser Klon wurde für weiterführende Experimente zur näheren Charakterisierung ausgewählt, da er im X- α -Galaktosidase-Test zur Quantifizierung von Interaktionen, die stärkste Wechselwirkung mit SP7 zeigte (Abb. 5.13 b).



5.13 Verifizierung der mit der Y2H-Methode isolierten potentiellen Interaktionspartner von SP7

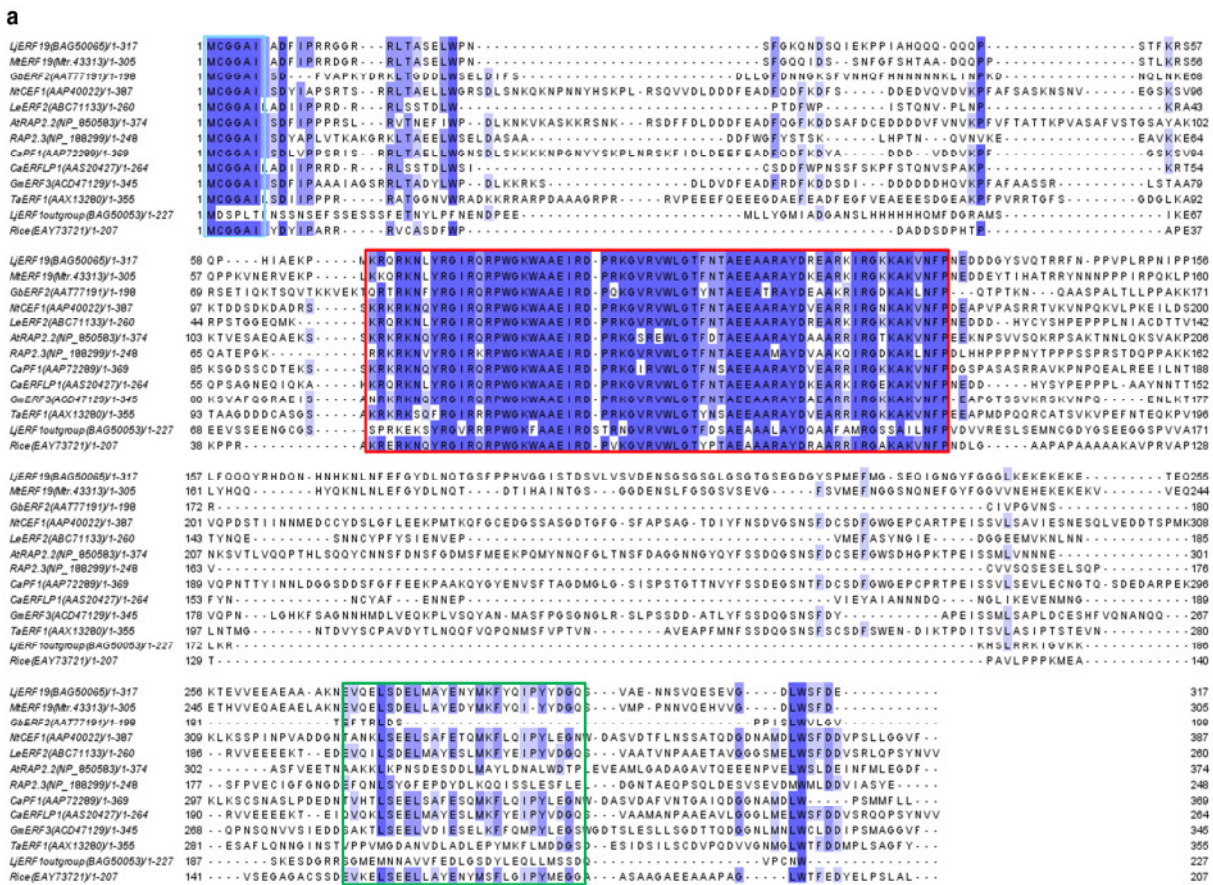
(a) Re-Transformation der Y2H-Klone: Die im Screen isolierten Proteine wurden in einem Mating erneut gegen SP7, sowie gegen das Protein Laminin (Lam), als Negativ-Kontrolle getestet. Auf SD-LWHA Medium bestätigten alle Klone ihre Interaktion mit SP7 und zeigten zugleich kein Wachstum in Kombination mit Lam.

(b) X- α -Galactosidase Test zur Quantifizierung der Interaktion von SP7 mit verschiedenen potentiellen Interaktionspartnern, die mittels dem Y2H Screen identifiziert wurden. Eine Blaufärbung der Kolonie tritt nur bei einer Interaktion des jeweiligen Proteins mit SP7 auf. Die Bezeichnungen der Klone können Tabelle 5-3 entnommen werden. Als Kontrolle wurden ein Hefestamm, transformiert mit dem Konstrukt pGADT7-RecT/pGBKT7-p53, aufgetragen. Die Blaufärbung dieses Stammes, kann als Referenz für eine starke Interaktion hinzugezogen werden. Der Klon SP7-R3 zeigte somit die stärkste Interaktion aller getesteten Klone.

Im Y2H-Screen konnte nicht die vollständige cDNA von MtERF19 isoliert werden. Jedoch gelang es mir durch eine BLASTn-Suche im *Medicago truncatula* Gene Index den zugehörigen N-Terminus zu identifizieren und eine vollständige chimäre Sequenz aus zwei TCs (TC118268 und TC116123) zu erstellen.

5 Ergebnisse

Der nächste Verwandte von Klon SP7-R3 ist der Transkriptionsfactor ERF19 von *Lotus japonicus* (NCBI Genbank BAG50065). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde Klon SP7-R3 der Name MtERF19 zugewiesen.



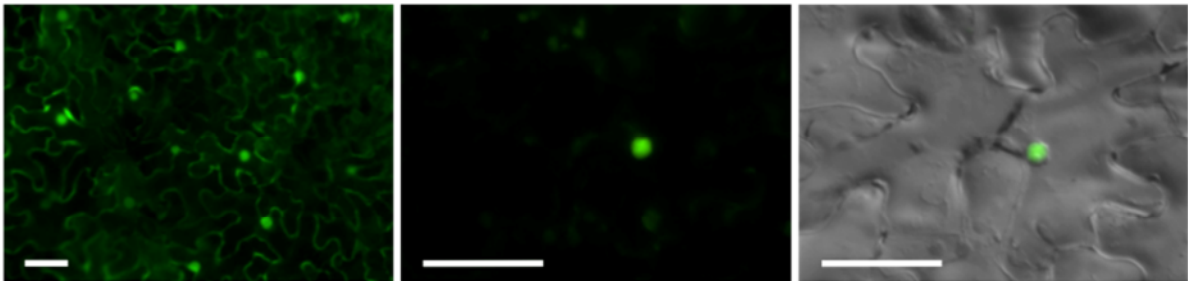
5.14 MtERF19 ist ein Transkriptionsfaktor der Klasse IV der ERF Transkriptionsfaktoren

(a) ClustalW Alignment einiger Mitglieder der Klasse IV der ERF Transkriptionsfaktoren und LjERF1. Alle Mitglieder dieser Klasse enthalten das konservierte Motiv MCGGAI/L am Aminoterminus (blauer Kasten). Hoch konservierte Bereiche befinden sich auch im Bereich der AP2-Domäne (roter Kasten) und dem coiled-coil Motiv (grüner Kasten).

(b) Phylogenetischer Baum der ERF Transkriptionsfaktoren der Klasse IV. Der Baum basiert auf dem Alignment (a) und wurde mit dem Programm MEGA 4.0 unter Verwendung des Neighbour-Joining-Algorithmuserstellt. Der Transkriptionsfaktor LjERF1 wurde als outgroup eingesetzt. Er enthält nicht das konservierte N-terminale Motiv der Klasse IV ERFs (a).

MtERF19 gehört zu neuen Klasse IV der ERFs (*Ethylene Response Factors*) Transkriptionsfaktoren, welche durch die konservierte, N-terminale Aminosäurefolge MCGGAIL/L charakterisiert werden (Tournier *et al.*, 2003). Eine systematische Suche nach weiteren konservierten Motiven offenbarte die Präsenz einer AP2 DNA-Bindedomäne sowie eines coiled-coil-Motivs am C-Terminus des Proteins. Außerhalb dieser funktionellen Domänen, zeigen die Mitglieder der Klasse IV der ERFs kaum konservierte Sequenzen (Abb. 5.14).

Da bioinformatisch überraschender Weise keine NLS identifiziert werden konnte, wurde die subzelluläre Lokalisation des putativen Transkriptionsfaktors überprüft. Hierzu wurde der vollständigen ORFs mit Hilfe der Sequenzinformationen aus der Medicago-Datenbank amplifiziert und als GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des 35S Blumenkohl-Mosaik-Virus Promotors (BMV) in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Wie Abb. 5.15 zeigt, konnte unter dem Epifluoreszenzmikroskop eine eindeutige Lokalisation des GFP-markierten MtERFs im pflanzlichen Zellkern observiert werden.



5.15 MtERF19 lokalisiert im Pflanzenzellkern

MtERF19 exprimiert unter der Kontrolle des 35S BMV Promotors lokalisierte im Nukleus von transient transformierten *N. benthamiana* Blättern. Die Bilder sind epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. In der rechten Abbildung wurden der GFP- und der Hellfeld-Kanal überlagert. Die Größenbalken repräsentieren je 50 μm .

Da es bei Proteinen mit DNA-Bindedomänen zu falsch positiven Interaktionen in einem Y2H-Screen kommen kann, aber auch um den Ort der Protein-Protein-Interaktion einzugrenzen, wurde eine verkürzte Version von MtERF19 ohne AP2-Domäne (MtERF19_{-AP2}), in einem direkten Mating mit SP Δ SP7 auf eine Interaktion getestet (Abb. 5.16). Trotz der Verkürzung konnte immer noch eine Interaktion zwischen SP7 und MtERF19 verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion von SP7 und MtERF19 scheint damit nicht oder zumindest nicht nur an die AP2-Domäne des Transkriptionsfaktors gekoppelt zu sein. Da eine solche Domäne oft für fälschlicherweise positiv getestete Interaktionen verantwortlich ist, qualifiziert dies die Wechselwirkung von SP7 und ERF19 weiter als tatsächliche Interaktion.

Mit Hilfe des 3-AT-Tests konnte ausgeschlossen werden, dass SP7 alleine in der Lage ist das Reporterogen *HIS3* des Y2H-Screens zu induzieren. Proteine die selbst über transkriptionsaktivierende Eigenschaften verfügen sind in der Lage auch ohne Interaktionspartner das *HIS3* Reporterogen zu transkribieren, was in einem falsch positiven Wachstum der Hefen resultiert. 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) ist ein kompetitiver Inhibitor des *HIS3* Proteins und führt dazu, dass trotz einer geringen Expression von *HIS3* nicht genügend Histidin synthetisiert werden kann um der Hefe das Wachstum zu ermöglichen. Auch gänzlich ohne Zugabe von 3-AT konnte jedoch beim Test des SP7-Expressionskonstruktes kein Wachstum der Hefeko-

5 Ergebnisse

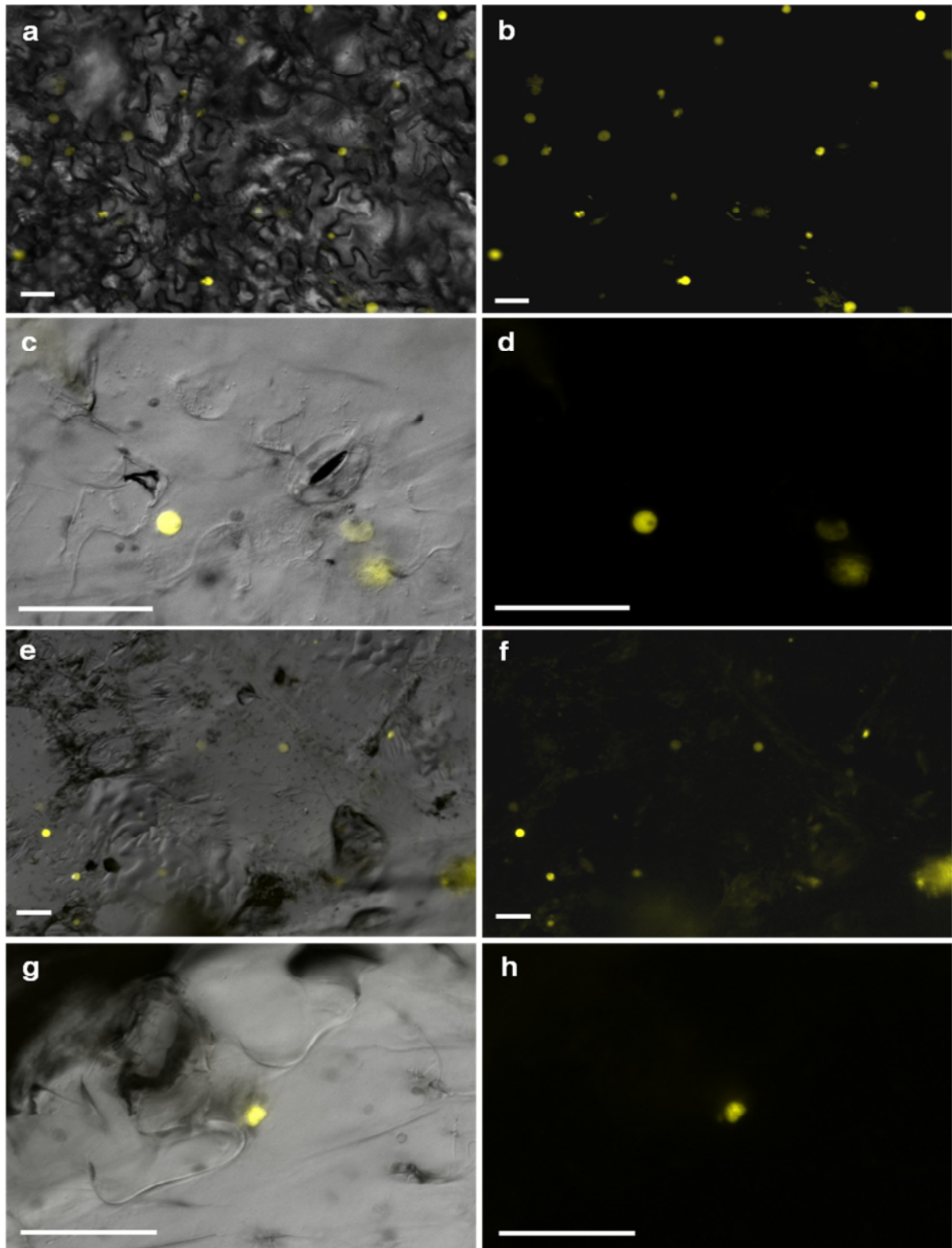
lonien beobachtet werden. SP7 ist somit nicht in der Lage ohne Interaktionspartner die Y2H-Reporter gene zu aktivieren. Bei dem Protein handelt es sich also sehr wahrscheinlich nicht um einen Transkriptionsfaktor, der alleine in die Genregulation der Pflanze eingreifen kann. Durch die Interaktion mit MtERF19 könnte jedoch eine solche Manipulation des Wirtes bewerkstelligt werden. Zur Untersuchung dieser These wurden im Folgenden die Expression von MtERF19 genauer analysiert.



5.16 Schematischer Überblick über die verschiedenen Versionen von MtERF19

Das vollständige MtERF19 Protein (303 AS) enthält 3 charakteristische Domänen. Das klassenzuweisende MCGGAI/L-Motiv (blau), die AP2-DNA-Bindedomäne (rot) und ein coiled-coil Motiv (grün). Der im Y2H-Screen isolierte Version (244 AS) fehlte der N-terminale Teil des Proteins, inklusive des MCGGAI/L-Motives. Eine verkürzte Version des Proteins, beginnend nach der AP2 Domäne (166 AS) wurde für einen Interaktionstest mit SP7 generiert.

Zur Validierung der im Y2H gefunden Interaktion von SP7 und MtERF19 wurde eine Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Analyse (BiFC) *in planta* durchgeführt. SP Δ SP7 und MtERF19 wurden unter der Kontrolle des 35S BMV Promotors als N-terminale Fusion entweder an den N-Terminus oder den C-Terminus von YFP mittels agrobakterieller Transformation exprimiert. Bei Interaktion der beiden zu testenden Proteine kommt es zur Komplementierung von YFP und dadurch zu einem gelben Fluoreszenz-Signal. Als Kontrolle wurde das Protein bZIP64 in den gleichen Vektorkonstrukten transformiert wie SP7 respektive MtERF19. Der Transkriptionsfaktor bZIP64 bildet ein Homodimer der im Zellkern lokalisiert. Wie Abb. 5.17 dokumentiert konnte sowohl bei der bZIP64-c/ pSPYCE-CYFP als auch bei SP7 Δ SP-NYFP/ MtERF19-CYFP eine eindeutige Lokalisation im Nukleus beobachtet werden. Mit Hilfe der BiFC-Methode konnte somit die im Y2H-Screen entdeckte Interaktion von SP7 und dem Transkriptionsfaktor MtERF19 bestätigt werden.



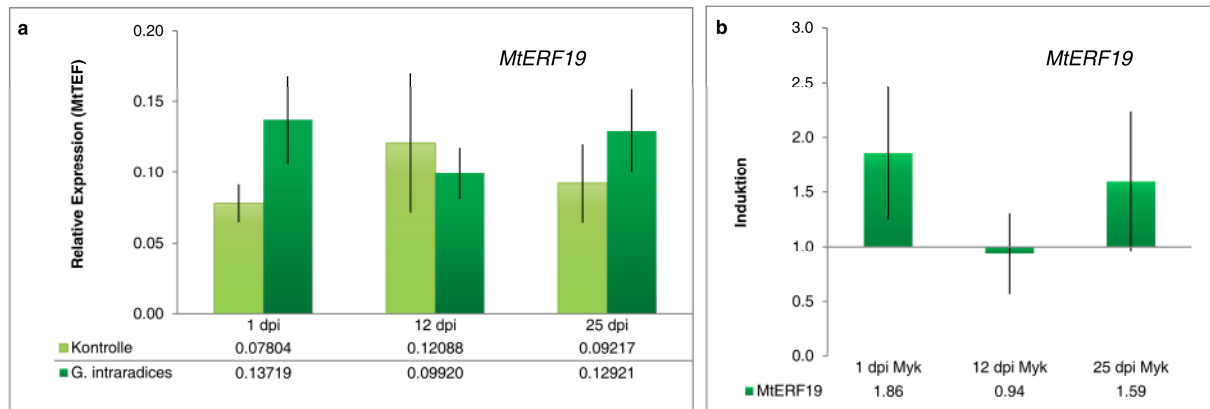
5.17 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Analyse (BiFC) der Interaktion von SP7 und MtERF19 in *N. benthamina* Blättern.

Die Expression der Proteine erfolgte unter Kontrolle des 35S BMV Promotors. Die rechte Spalte zeigt Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. In der linken Spalte wurde jeweils der YFP-Kanal mit der Hellfeldaufnahme überlagert. Die Größenbalken stellen je 50 μm dar.

(a-d) Die zur Kontrolle transformierten Fusionsproteine bZIP64-CYFP und bZIP64 NYFP bilden ein Dimer, welches im Pflanzenzellkern lokalisiert.

(e-h) Bei Transformation von MtERF19-CYFP und SP7 Δ SP-NYFP in *N. benthamina* konnte nach 3 Tagen ein deutliches YFP-Signal im Zellkern der transformierten Blätter beobachtet werden.

Die im MtGEA aufgeführte AM Probe wurde nach 30 Tagen der Symbiose, also zu einem relativ späten Zeitpunkt auf das Transkriptlevel von *MtERF19* untersucht. Zur genaueren Analyse der Expression im Verlauf der Mykorrhizierung, wurden *M. truncatula* Pflänzchen, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, mykorrhiziert und 1, 12 und 25 Tage nach der Inokulation (dpi) Proben entnommen. Mittels Real-Time RT-PCR wurde das Expressionslevel von *MtERF19* in den jeweiligen Proben untersucht. Im Vergleich zu den gleichbehandelten Kontrollpflanzen zeigte sich nur beim frühesten Zeitpunkt eine leichte, transiente Induktion von *MtERF19* (Abb. 5.19).



5.19 *MtERF19* wird im Verlauf der AM-Symbiose kaum induziert

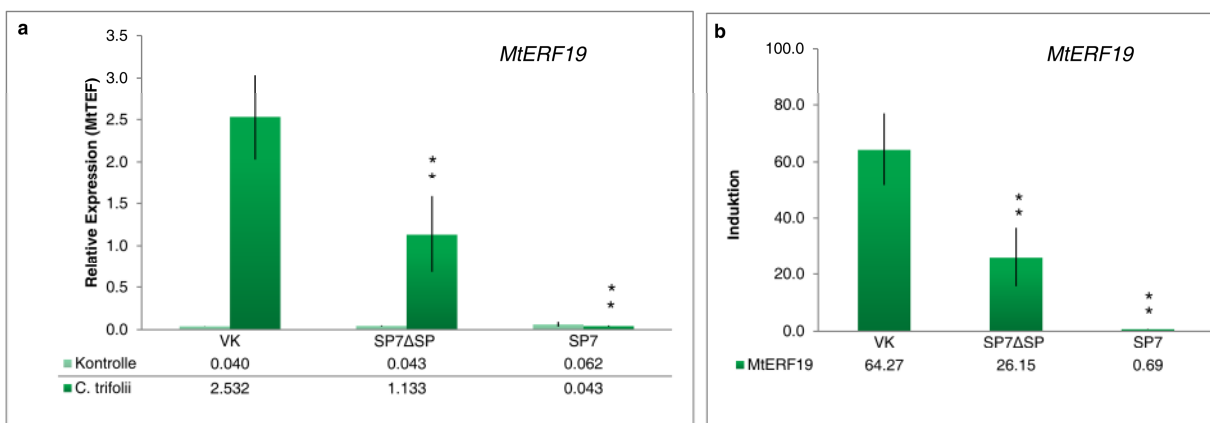
Im Verlauf der Mykorrhizierung mit *G. intraradices* lies sich in den Wurzeln von *M. truncatula* Pflänzchen nur nach einem Tag eine leichte Induktion im Vergleich zur nicht-mykorrhizierten Kontrolle erkennen. Zu den späteren Testzeitpunkten konnten keine signifikanten Änderungen des Expressionslevels gezeigt werden.

(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur jeweiligen nicht mykorrhizierten Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Da viele Mitglieder der Klasse IV Familie der ERFs Pathogenitäts-abhängig induziert werden, wurde die Expression von *MtERF19* in verschiedenen *hairy root*-Linien, die dem Pathogen *Colletotrichum trifolii* für 3 Tage ausgesetzt waren, untersucht (Abb.5.20).



5.20 Die Expression von SP7 reduziert die Induktion von *MtERF19* bei pathogenen Infektionen

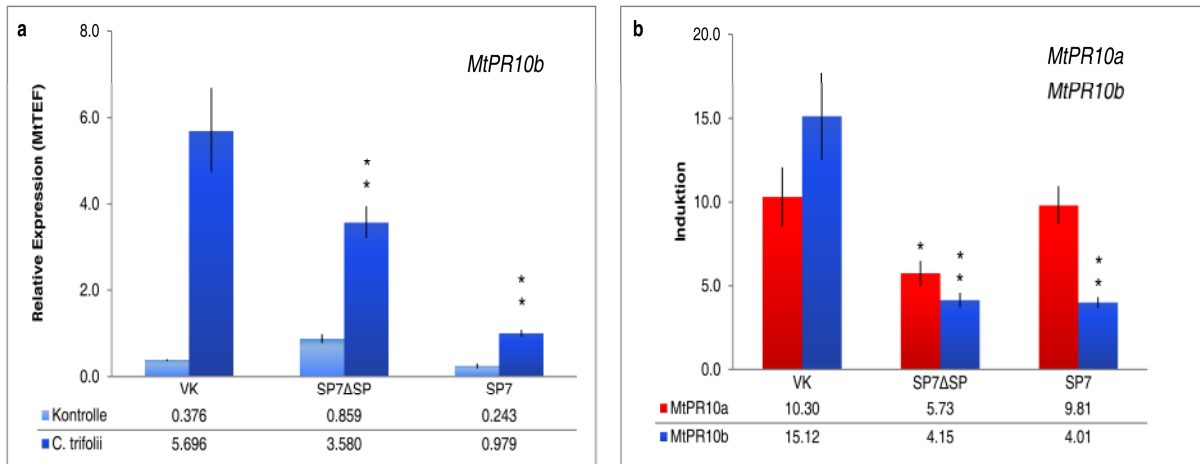
Analyse der *MtERF19* Expression nach Infektion stabiltransformierter *M. truncatula* hairy root Linien mit *Colletotrichum trifolii*. VK bezeichnet die Vektorkontroll-Linie.

(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar je einer repräsentativen Linie für jedes Konstrukt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte der infizierten VK mit $***p < 0.01$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Expression der Abwehrgene *PR10a* und *PR10b* wurde in den mit dem Pathogen *C. trifolii* inkubierten *hairy root*-Linien untersucht. Tatsächlich konnte für *PR10b* eine reduzierte Hochregulation im Vergleich zur Vektorkontrolle beobachtet werden sowohl für die *SPΔSP7* exprimierenden Wurzellinien, als auch für jene die konstitutiv das vollständige SP7 produzieren. Für *MtPR10a* hingegen konnte keine signifikante Änderung des Induktionslevels festgestellt werden (Abb. 5.22).



5.22 Die konstitutive Expression von SP7 reduziert die Induktion von *PR10b*

Transkript-Akkumulation von *MtPR10b* nach Infektion von stabil transformierten *M. truncatula hairy root*-Linien mit *C. trifolii*. Im Vergleich zur Vektorkontroll-Linie (VK) war eine deutlich reduzierte Expression von *MtPR10b* in den Linien *SP7ΔSP*-GFP und *SP7*-GFP zu erkennen. Bei *MtPR10a* konnte keine so eindeutige Änderung der Induktion beobachtet werden.

(a) Expressionslevel von *MtPR10b* relativ zu *MtTEF*.

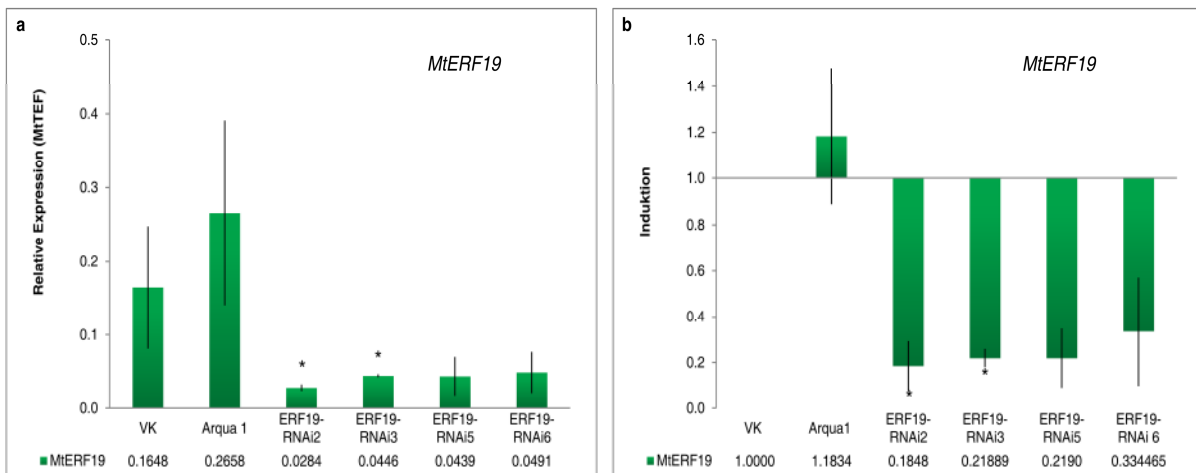
(b) Induktion von *MtPR10a* und *MtPR10b* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate, je einer repräsentativen Linie für jedes Konstrukt, dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte der infizierten VK mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um weitergehend die Rolle von *MtERF19 in planta*, bzw. die Folgen der SP7-vermittelten Regulation von *MtERF19* zu untersuchen, wurden *MtERF19*-RNAi sowie Überexpressions-*hairy root*-Linien generiert und auf ihren Mykorrhizierungs-Phänotyp hin untersucht.

Zur Transkript-Reduktion wurde ein 234 bp Fragment von der -38 bp bis zur +196 bp Region (hinsichtlich des ATGs) von *MtERF19* aus gDNA amplifiziert und in den RNAi-vermittelnden Vektor pK7GWIWG(II),0 rekombiniert. Das Fragment integriert in diesem Vektor sowohl vorwärts, als auch in rückwärtiger Orientierung. Bei einer Expression der Konstrukte unter Kontrolle des 35S Promotors führt dies zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur, die in dem Abbau der zur dsRNA komplementären mRNA resultiert. Durch Agrobakterielle Transformation konnten zehn *hairy root*-Linien generiert werden. Für vier dieser Linien konnte auch nach mehreren Runden der Weiterkultivierung mittels Real-Time-PCR ein stabiles, reduziertes Expressionslevel von *MtERF19* im Vergleich zur Vektorkontrolle und der Linie ARqua1 (Transformationskontrolle) ermittelt werden (Abb. 5.23). Besonders die Linien *ERF19*-RNAi2 und *ERF19*-RNAi3 zeigten eine signifikante Transkript-Reduktion von 83% bzw. 72%. Keine der Linien zeigte im nicht-mykorrhizierten Zustand Entwicklungsdefekte irgendeiner Art.

5 Ergebnisse



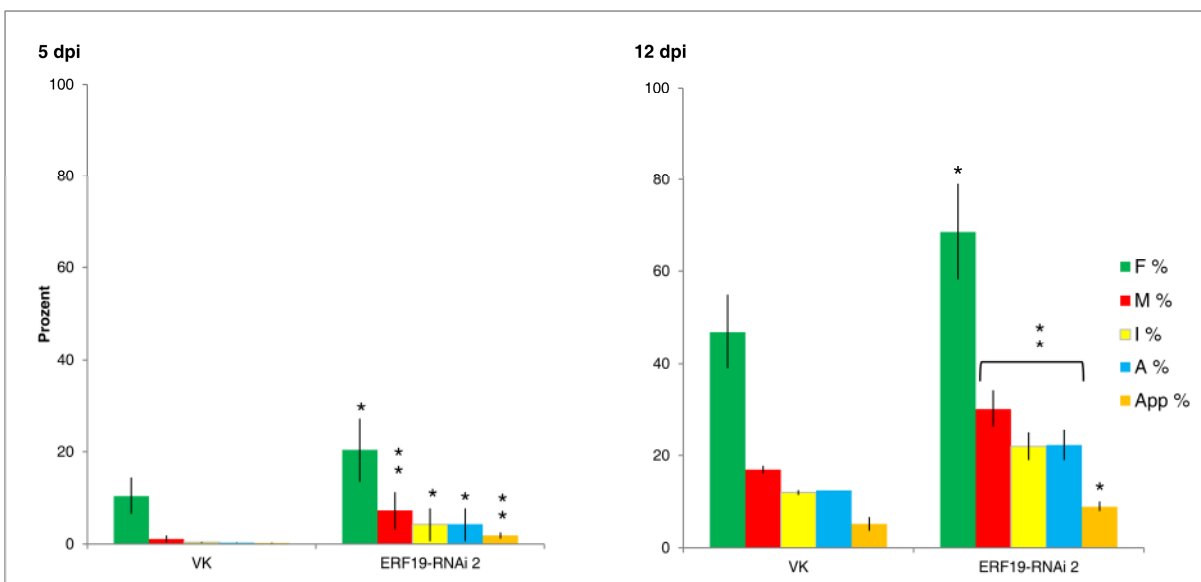
5.23 Erfolgreiche Reduktion der *MtERF19*-Transkript-Menge durch RNAi in *M. truncatula* hairy roots.

(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur Vektorkontrolle (VK).

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte der infizierten VK mit * $p < 0.05$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Mykorrhizierungsexperimente wurden mit mehreren RNAi-Linien durchgeführt und eine mit dem leeren Vektor transformierte Kontroll-Linie als Referenz eingesetzt. Abb. 5.24 zeigt die Verrechnung von drei Replikaten der repräsentativen Linie ERF19-RNAi2. Bereits 5 Tage nach der Inokulation ließen sich bei dieser Linie eine eindeutig gesteigerte Mykorrhizierung bezüglich aller untersuchten Parameter ermitteln. Die reduzierte Menge an *MtERF19* Transkripten wirkte sich somit bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Symbiose förderlich auf die pilzliche Kolonisation der Pflanze aus.



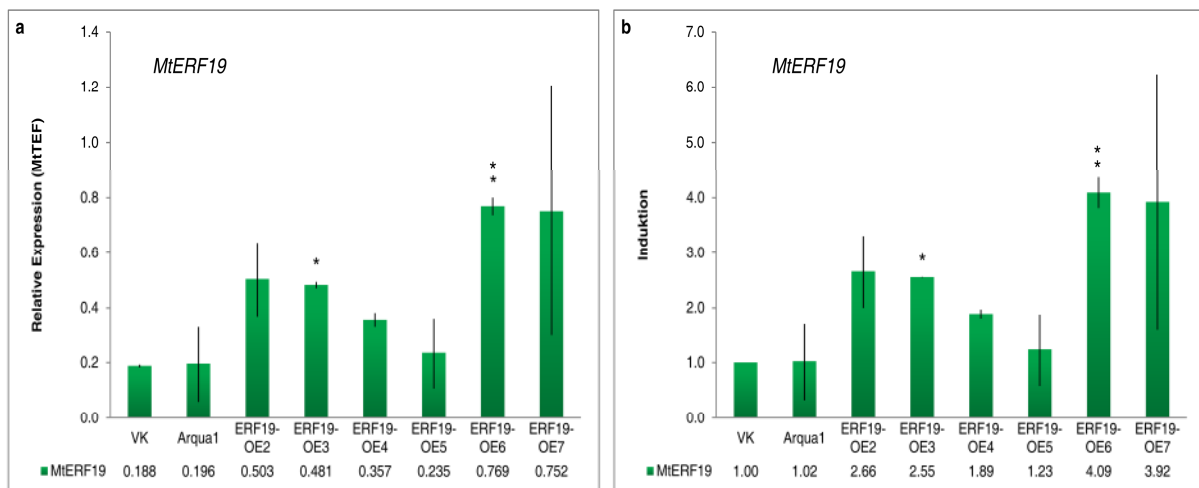
5.24 RNAi von *MtERF19* führt zu einem erhöhten Level der pilzlichen Kolonisation in *M. truncatula* hairy roots

Beurteilung des Mykorrhizierungslevels der RNAi-Linie ERF19-RNAi2. Im Vergleich zur Vektorkontroll-Linie (VK) zeigte die RNAi-Linie zu beiden Zeitpunkten eine weiter fortgeschrittene Mykorrhizierung. Die zur Bewertung hinzugezogenen Parameter: Frequenz (F%) und Intensität (M%) der Mykorrhizierung sowie Abundanz der intraradikalischen Hyphen (I%), der Arbuskeln (A%) und der Appressorien (App%).

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate je einer repräsentativen VK- und ERF19-RNAi-Linie dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte aller Parameter der VK mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Auch zum zweiten Zeitpunkt der Probenahme, nach 12 Tagen, konnte eine signifikante Steigerung des Mykorrhizierungsgrades in der RNAi-Linie im Vergleich zur Vektorkontrolle beobachtet werden. Die Reduktion der Transkriptmenge von *MtERF19* führte somit zu einem vergleichbaren Phänotyp wie die konstitutive Expression von *SP7*. Dies stützt die These, dass *SP7* regulierend in die Transkriptakkumulation von *MtERF19* in den Pflanzenzellen eingreift.

Zur Überexpression von *MtERF19* wurde das vollständige ORF des Gens unter Kontrolle des 35S BMV Promotors im Vektor pCGFP-RedRoot exprimiert. Von den 10 resultierenden *hairy root*-Linien wurden sechs Linien nach mehreren Kulturzyklen zur Analyse des Expressionslevels von *MtERF19* mittels Real-Time-PCR ausgewählt. Eine stabile und signifikante Überexpression konnte hierbei bei den Linien ERF19-OE3 und ERF19-OE6 im Vergleich zur Transformations- und zur Vektorkontrolle vermerkt werden (Abb. 5.25). Die Wurzeln zeigten im nicht-symbiotischen Zustand keine Wachstumsabnormalitäten im Vergleich zu den Kontrolllinien und auch keine sonstigen phänotypischen Auffälligkeiten.



5.25 Stabile Überexpression von *MtERF19* in zwei *M. truncatula hairy root* Linien

Überexpression von *MtERF19* in *hairy root*-Linien transformiert mit *MtERF19* unter der Kontrolle des 35S BMV Promotors.

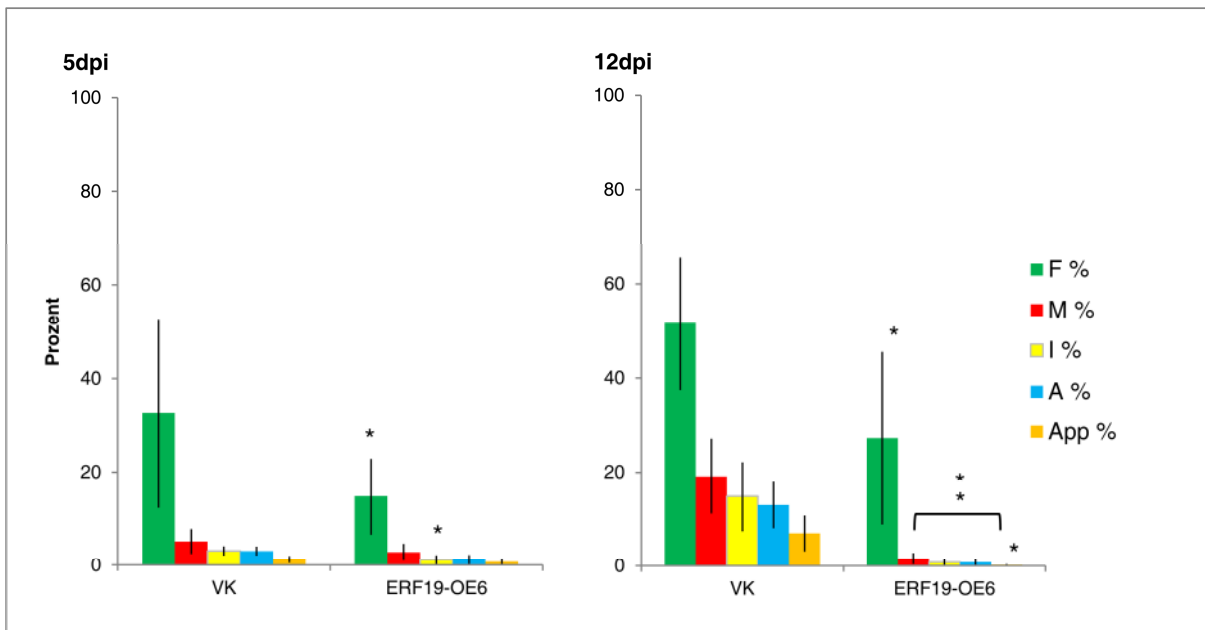
(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur Vektorkontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Vektorkontrolle (VK) mit $*p < 0.05$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Für die *in vitro* Mykorrhizierung wurde die Linie ERF19-OE6 eingesetzt in der die Expression von *MtERF19* im Vergleich zur Vektorkontrolllinie 77% gesteigert war. Für diese Linie konnte sowohl nach 5 Tagen, als auch nach 12 Tagen der Inokulation ein geringerer Grad der Mykorrhizierung beobachtet werden, als in der gleich behandelten Kontrollprobe (Abb. 5.26). Die Überexpression von *MtERF19* führte somit zum gegenteiligen Phänotyp bei der Mykorrhizierung wie das RNAi-Experiment. Dieses Ergebnis bestätigte somit aber die Annahme dass die Interaktion von *SP7* mit *MtERF19* zu einer Reduktion des Transkripts des Transkriptionsfaktors führt, was sich wiederum positiv auf die Etablierung der AM in den transgenen Wurzeln auswirkt.

5 Ergebnisse



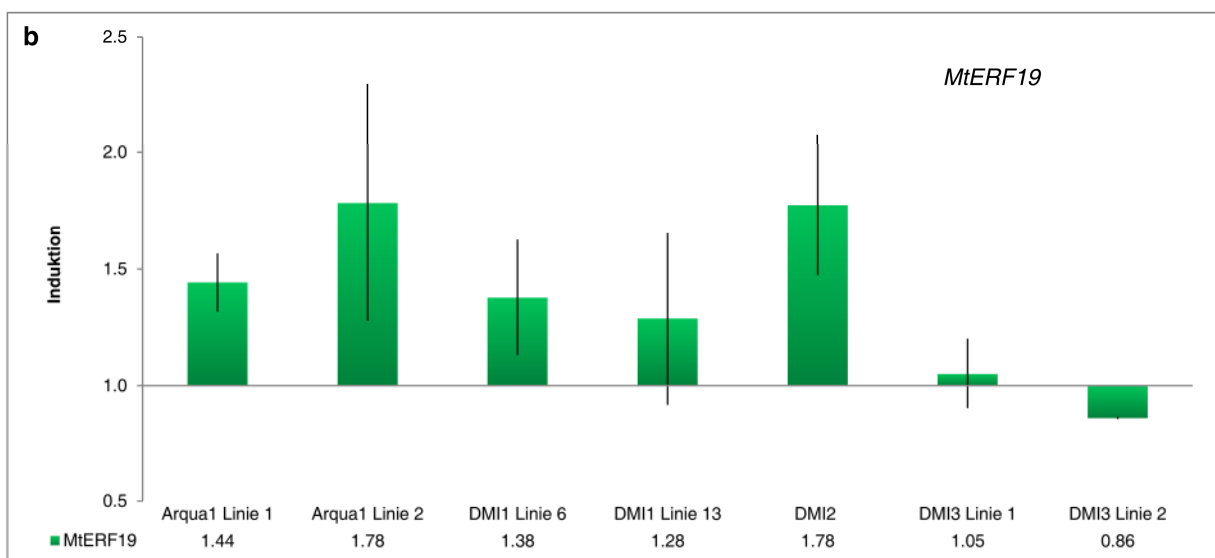
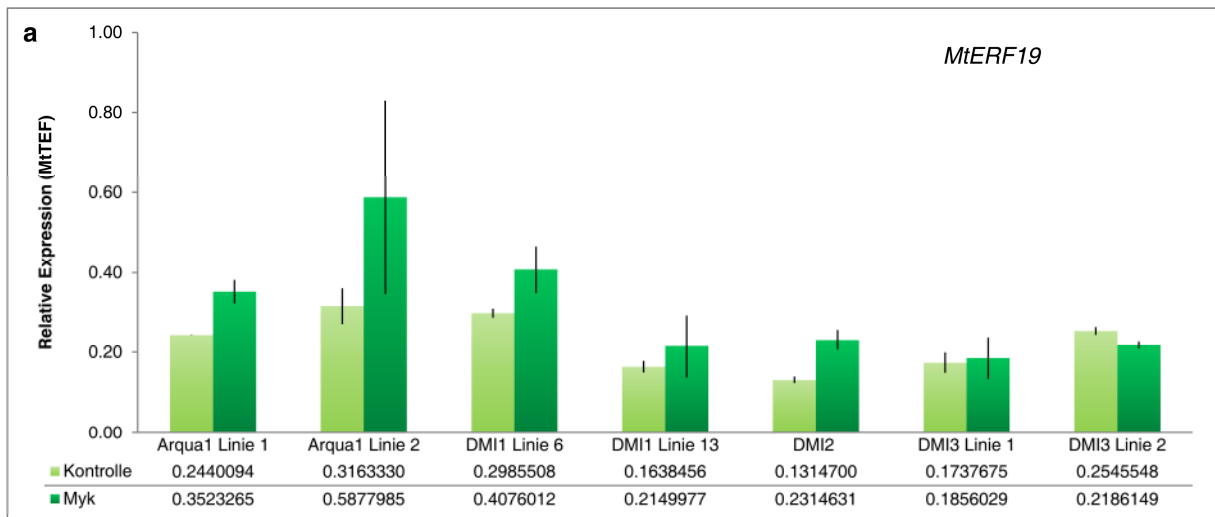
5.26 Die Überexpression von *MtERF19* wirkt sich negativ auf die pilzliche Kolonisierung aus

Beurteilung des Mykorrhizierungslevels 5 und 12 Tage nach der Inokulation (dpi) mit *G. intraradices*. Die *MtERF19*-Überexpressionslinie ERF19-OE6 zeigte im Vergleich zur Vektorkontrolle (VK) eine weniger fortgeschrittene Ausbildung der AM-Symbiose bezüglich aller untersuchten Parameter [Frequenz (F%) und Intensität (M%) der Mykorrhizierung sowie Abundanz von der intraradikalen Hyphen (I%), der Arbuskeln (A%) und der Appressorien (App%)].

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate je einer repräsentativen Linie für jedes Konstrukt dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte aller Parameter der VK mit *p < 0.05 und **p < 0.01. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Es ist bekannt, dass mindestens zwei Signalkaskaden zur Etablierung der AM erforderlich sind (Kuhn *et al.*, 2010). Der SYM-Signalweg beruht maßgeblich auf der Funktion der Proteine DMI1, DMI2 und DMI3 (Kapitel 2.1). Im Folgenden wurde in Zusammenarbeit mit Hannah Kuhn getestet, ob die Induktion von *MtERF19* in Abhängigkeit von einem dieser drei Proteine erfolgt. Hierzu wurden *hairy root*-Linien mit Mutationen (Kapitel 3.1.9) in je einem der drei *DMI* Gene, mit Hyphen von *G. intraradices* induziert und die Expression von *MtERF19* mit der Expression in nicht induzierten Kontrollwurzeln sowie der *hairy root* Kontrolllinie Arqua1 verglichen. Die Induktion erfolgte für 24h, da sich wie aus Abb. 5.19 ersichtlich nur zu diesem frühen Zeitpunkt eine leichte Induktion von *MtERF19* im Verlauf der Mykorrhizierung messen ließ.

Jedoch zeigte keine der getesteten Linien eine signifikante Änderung des Expressionslevels von *MtERF19* weder im Vergleich zum nicht mykorrhizierten Zustand noch im Vergleich zu den ARqua1 Linien (Abb. 5.27). Auffällig war jedoch, dass bei den beiden getesteten DMI3 Linien die niedrigste Induktion bzw. sogar eine Reduktion der Expression vorlag. Ob dies ein tatsächlicher Effekt der Mutation in DMI3 ist, sollte daher noch einmal überprüft werden. Aufgrund der nur sehr schwachen Induktion von *MtERF19* in der AM, könnte auch ein tatsächlicher Effekt nur sehr schwach ausfallen. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich aber keine Rolle der SYM-Signalkaskade in der Regulation der Expression von *MtERF19* belegen.



5.27 Die nur leichte Induktion von *MtERF19* während der AM-Symbiose ist unabhängig von der SYM-Signalkaskade

(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Kontrollprobe ergab keine Signifikante Regulation. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

5 Ergebnisse

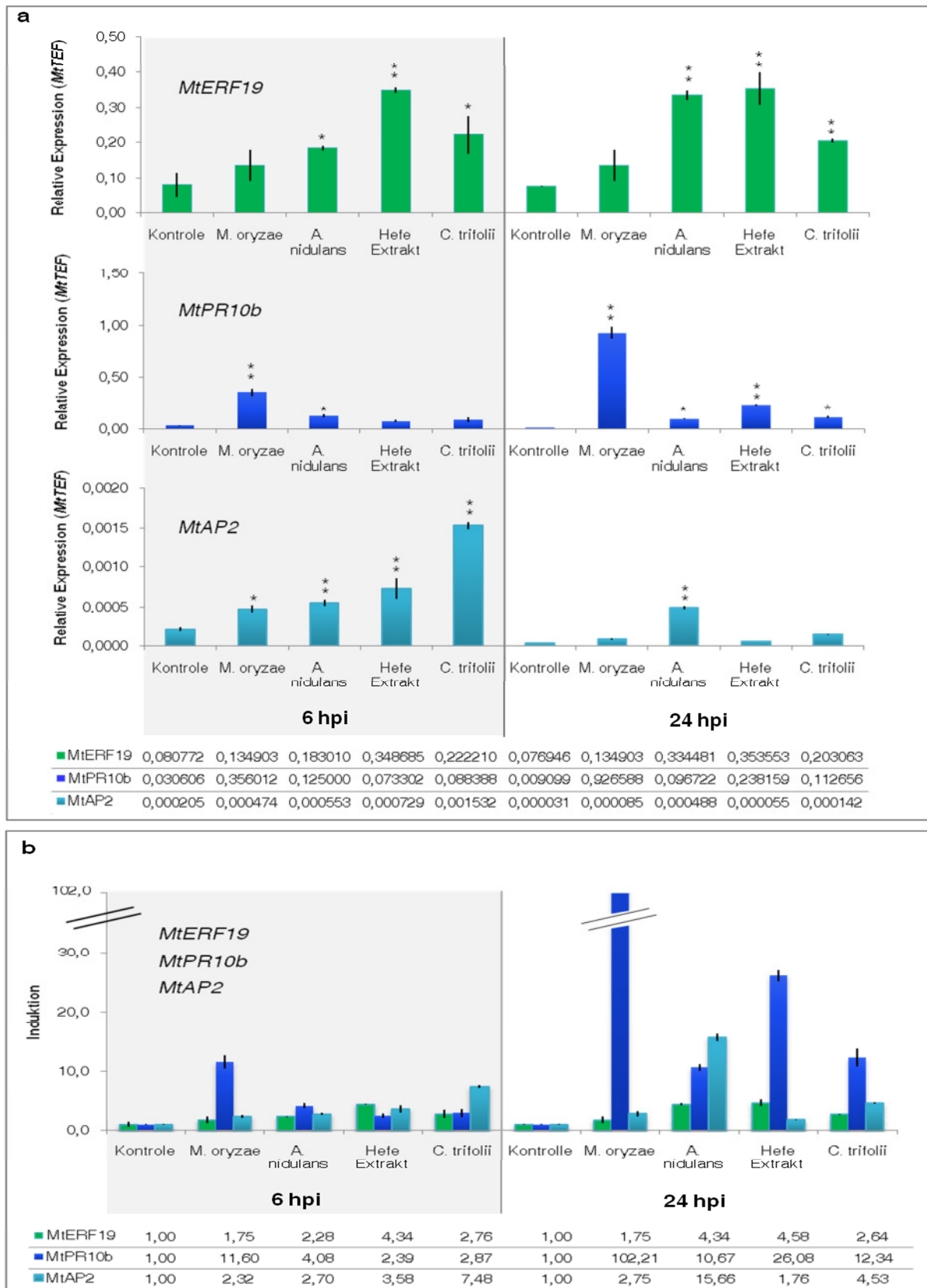
5.2.6 MAMP-induzierte Expression von *MtERF19*

In vorangegangenen Experimenten konnte ich zeigen, dass die Expression von *MtERF19* durch die Behandlung mit dem Pathogen *C. trifolii* stark, jedoch bei Kontakt mit *G. intraradices* nur leicht und transient induziert wird. Es ist bekannt dass die Perzeption von verschiedenen MAMPs (*Microbe associated Molekular Pattern*) zur Induktion einer schnellen Abwehrreaktion führt, die neben der Produktion von ROS und einer Alkalinisation des Mediums auch die Produktion von Ethylen beinhaltet (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez und Boller, 2000). Dies könnte zur Induktion von *MtERF19* führen. Daher sollte im Folgenden untersucht werden ob und welche MAMPs für eine Induktion des *M. truncatula* Transkriptionsfaktors verantwortlich sind.

Zu diesem Zwecke wurden von verschiedenen pathogenen sowie apathogenen Pilzen Extrakte der Sporen und Hyphen vorbereitet, in M-Medium aufgenommen und *M. truncatula* Keimlinge darin für 6 h bzw. 24 h inkubiert. Kontrollpflanzen wurden 6 h bzw. 24 h in M-Medium gehalten. Mit Hilfe einer Real-Time-PCR Analyse wurde die Induktion von *MtERF19* als Reaktion auf die unterschiedlichen Extrakte ermittelt. Zudem wurden die Proben hinsichtlich der Expression von *MtPR10b* untersucht, ein Abwehr-abhängiges Protein, das während der Infektion von *hairy roots* mit *C. trifolii* deutlich hochreguliert wurde. Desweiteren wurde die Transkriptmenge von *MtAP2* gemessen. Hierbei handelt es sich um das nächste *M. truncatula* Homolog eines *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktors, dessen Expression als Antwort auf Chitin -ein bekanntes pilzliches MAMP- hochreguliert wird (Abb. 5.28)

Die Behandlung der Pflänzchen mit den Pilzextrakten führte sowohl nach 6 h sowie nach 24 h zu einer klaren Induktion von *MtERF19* in allen getesteten Extrakten. Ebenso ließ sich bei allen Proben eine starke Induktion des Abwehr-Gens *MtPR10b* observieren. Dieser Effekt zeigte sich bereits nach 6 h, war aber in den Proben des zweiten Testzeitpunkts noch deutlicher zu erkennen. Für *MtAP2* hingegen konnte eine Akkumulation des Transkriptes im Besonderen nach 6 Stunden beobachtet werden, was der typischen schnellen Reaktion der Pflanzenzelle bei Perzeption von Chitin entspricht (Ramonell *et al.*, 2002). Da dieses Induktionsmuster jedoch nicht mit dem von *MtERF19* korreliert, ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei Chitin um das gesuchte MAMP handelt. In einem weiteren Experiment wurde von Hannah Kuhn getestet ob die Applikation von Chitin aus Krabbenpanzern oder von Chitotetraose auf Pflänzchen zu einer Induktion von *MtERF19* führt. Eine solche Beobachtung konnte allerdings nicht gemacht werden (nicht publizierte Daten, Hannah Kuhn).

Die unterschiedlichen Levels der Induktionsstärke bei den verschiedenen Pilzextrakten könnten auf die unterschiedliche Zusammensetzung der pilzlichen Zellen bzw. unterschiedliche Mengen des *MtERF19* induzierenden MAMPs zurückzuführen sein. Allerdings lässt sich diese These mit diesem Experiment nicht belegen, da es sich methodisch als extrem schwierig erwies exakt gleiche Mengen an Pilzmaterial für die Herstellung der Extrakte einzusetzen. Dieses Experiment lässt jedoch darauf schließen, dass die Expression von *MtERF19* durch ein geläufiges pilzliches MAMP erfolgt. Chitin konnte als eben diese ausgeschlossen werden.



5.28 Extrakte verschiedener Pilze induzieren die Expression von *MtERF19*

Transkript-Akkumulation von *MtERF19* 6 und 24 Stunden nach der Induktion (hpi) von *M. truncatula* Wurzeln mit Sporenextrakten verschiedener Pilze.

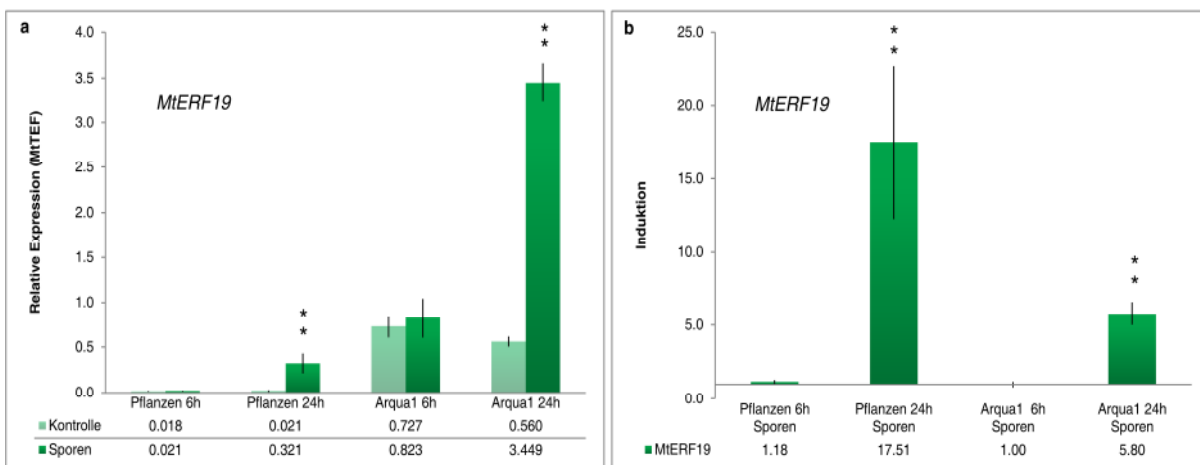
(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Kontrollprobe mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$. In (b) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Angabe der Signifikanz verzichtet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

5 Ergebnisse

Da sich im Verlauf der Mykorrhizierung im Gegensatz zur Behandlung mit dem Pathogen *C. trifolii* keine eindeutige Induktion von *MtERF19* ermitteln ließ, sollte nun geklärt werden, ob dies auf das Fehlen des *MtERF19*-aktivierenden MAMPs bei AM-Pilzen zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde auch aus Sporen von *G. intraradices* ein vergleichbares Extrakt angefertigt und *M. truncatula* Pflänzchen, sowie *hairy roots* für 6h und 24h damit inkubiert. Überraschenderweise zeigte sich in beiden getesteten Pflanzenproben nach 24 h eine Induktion von *MtERF19*, vergleichbar mit der durch die anderen Pilzextrakte ausgelösten Expressionszunahme (Abb. 5.29).



5.29 *G. intraradices* MAMPs induzieren die Expression von *MtERF19*

Transkript Akkumulation von *MtERF19* in der Wurzeln von *M. truncatula* Pflänzchen, sowie in *hairy roots* 6 und 24 Stunden nach der Inokulation mit einem Extrakt aus *G. intraradices* Sporen.

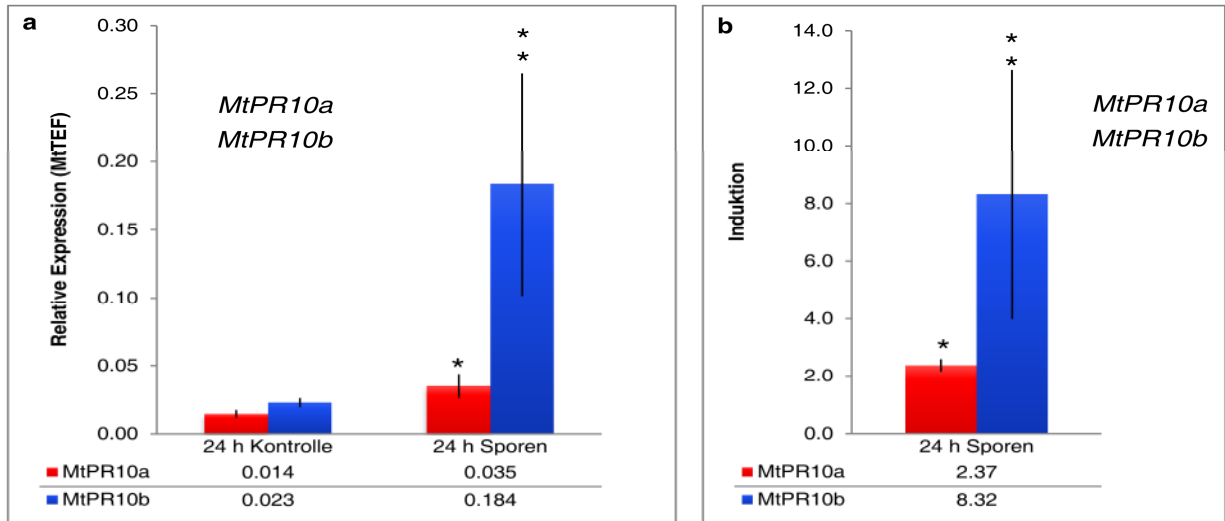
(a) Expressionslevel von *MtERF19* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtERF19* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die jeweilige Kontrollprobe mit $**p < 0.01$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um diese Entdeckung weiter molekular zu untersuchen, wurden in den für 24 h dem *G. intraradices* Sporenextrakt ausgesetzten Pflänzchen, die Transkript Akkumulation von *PR10b* via Real-Time-PCR analysiert. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zu den vorangegangenen Extrakten anderer Pilze. Nach 24 Stunden konnte eine hoch signifikante Induktion von *MtPR10b* und eine etwas leichtere von *MtPR10a* festgestellt werden (Abb. 5.30).

Dies lässt vermuten, dass die abgemilderte Induktion von *MtERF19* und *MtPR10b* auf die Effektorwirkung von SP7 oder andere vom AM-Pilz sezernierter Moleküle zurückzuführen ist. Diese Entdeckung, dass ein AM-pilzlichen Proteins in der Lage ist Teile der Immunabwehr der Pflanze zu unterdrücken, stellt eine fundamentale und neue Erkenntnis dar, die weitgreifenden Folgen für das Verständnis der AM-Symbiose haben könnte.



5.30 *G. intraradices* MAMPs induzieren pflanzliche PR-Gene

(a) Expressionslevel von *MtPR10a* und *MtPR10b* relativ zu *MtTEF*.

(b) Induktion von *MtPR10a* und *MtPR10b* normalisiert zu *MtTEF* und relativ zur jeweiligen nicht infizierten Kontrolle.

Die Daten stellen die Verrechnung dreier biologischer Replikate je einer repräsentativen Linie für jedes Konstrukt dar. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Werte der infizierten VK mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

5.2.7 SP7 verlängert die biotrophe Phase der Wurzelinfektion des Reis-Pathogens *Magnaporthe oryzae*

Die bisherigen Resultate deuten darauf hin, dass das Protein SP7 über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MtERF19 eine Rolle dabei spielt, die MAMP induzierte Immunität der Pflanzen (PTI) abzuwenden und so dem Pilz die Etablierung des biotrophen Status zu ermöglichen. Um diese These zu überprüfen und um zu testen, ob es sich bei SP7 um einen „universellen“ Effektor handelt, der auch in anderen Pilz-Pflanze-Interaktionen funktionell ist, wurde SP7 in *Magnaporthe oryzae* exprimiert. *M. oryzae* ist der Erreger des Reisbrandes und ein wirtschaftlich bedeutendes Pflanzenpathogen in tropischen und subtropischen Regionen. Lange Zeit war *M. oryzae* nur als Schädling der Reisblätter bekannt, doch wie Sesma und Osbourn (2004) zeigen konnten, kann der Pilz auch über deren Wurzeln die Reispflanzen systemisch infizieren. Der Schädling verfolgt eine hemibiotrophe Lebensweise bei Infektionen: Nach einer kurzen biotrophen Phase erfolgt der Wechsel zu necrotropher Lebensweise. Aus diesem Grund erscheint *M. oryzae* als sehr geeigneter Organismus zur Untersuchung der Auswirkungen von SP7 während des Infektionsprozesses. Effektorfunktionen, die der Etablierung/ Beibehaltung der biotrophen Phase bei AM-Pilzen dienen, könnten bei *M. oryzae* in einem Hinauszögern des Wechsels zum nekrotrophen Wachstum resultieren.

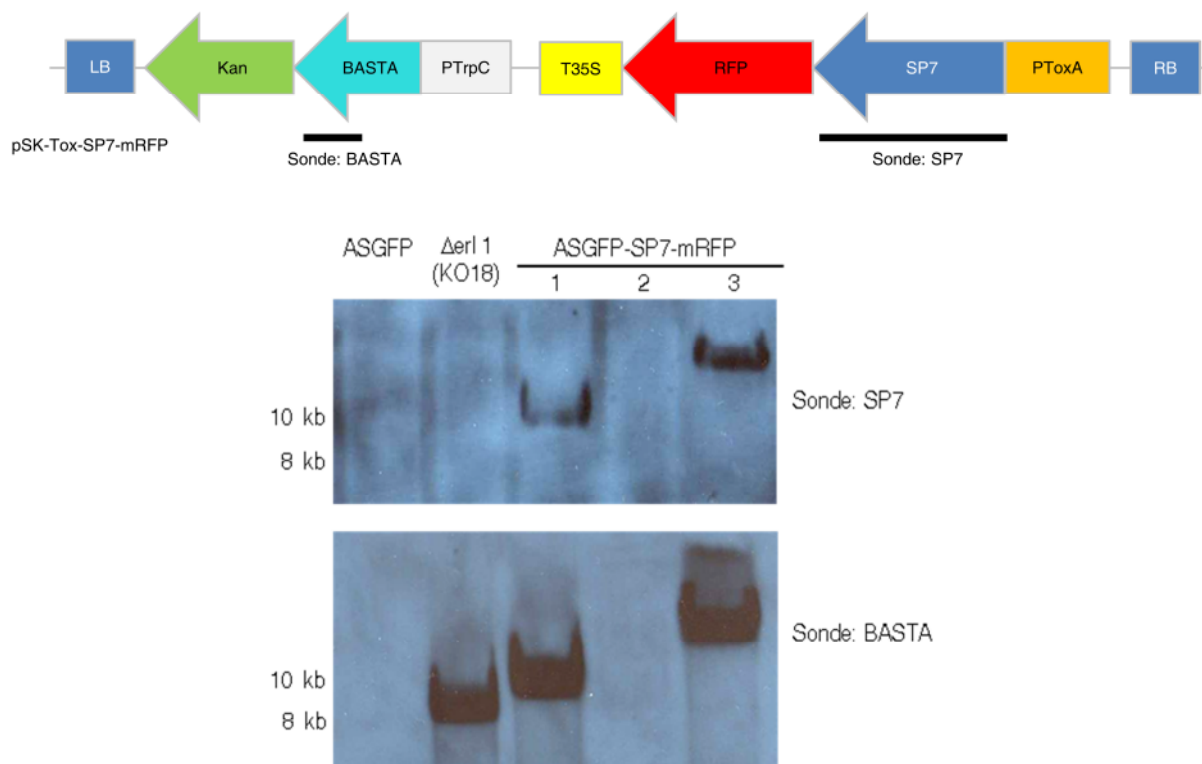
Die Expression von SP7 erfolgte als Fusionsprotein mit dem rot fluoreszierenden Protein mRFP kontrolliert durch den Tox-Promotor aus *Pyrenophora tritici-repentis*. Hierfür wurde der binäre Vektor pK7RWG2,0 wie in Abschnitt 4.2.9. beschrieben modifiziert und mit einer BASTA-Resistenz-Kassette zur Selektion der erfolgreich transformierten *M. oryzae*-Kolonien auf BASTA-supplementierten Kompletmedium ausgestattet (Abb. 5.31). Transformiert wurde der grün leuchtende Stamm ASGFP, der einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Phänotyp während des Infektionsprozesses zeigt.

Die aus der Transformation resultierenden Kolonien wurden durch Southern Blot Analyse, unter Verwendung von Sonden komplementär zu SP7 bzw. der BASTA-Kassette untersucht. Als Kontrollen wurde gDNA aus dem untransformierten ASGFP sowie dem, die BASTA-Kassette enthaltenden, Stamm Δ erl1 eingesetzt. Wie Abb. 5.31 zeigt handelte es sich nur bei den Klonen SP7-mRFP-1 und SP7-mRFP-3 um echte Transformanten, bei denen die einmalige Integration der BASTA-Kassette und von SP7 nachgewiesen werden konnte. Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden mit diesen beiden Stämmen durchgeführt.

Zunächst wurde die Funktionalität der Expression von SP7 sowie der Sekretion des Proteins in diesem heterologen System überprüft. Der Zwiebelhäutchen Test (Abschnitt 4.2.10) bietet hierfür eine ausgezeichnete Möglichkeit. Bei dieser Methode können die Bildung von Appressorien und invasiver Hyphen im Verlaufe des Infektionsprozesses des Pflanzenpartners unter dem Mikroskop sehr gut beobachtet und dokumentiert werden. Die Methode wurde leicht modifiziert durchgeführt, um das Abtöten der Zwiebelzellen im Verlauf der Präparation zu vermeiden. Die isolierten Zwiebelhäutchen wurden dann auf einem Objektträger platziert und mit einem Tropfen einer Sporensuspension der verschiedenen Stämme inokuliert. Nach 24 h sowie 48 h wurde die Appressorienbildung, sowie die Ausbildung intrazellulärer Infektionsstrukturen unter dem Konfokalmikroskop überprüft. Tatsächlich konnte eine Akkumulation

von SP7-mRFP in den Zellkernen der Zwiebelzellen beobachtet werden (Abb. 5.32 a,b). Dies beinhaltet eine erfolgreiche vorangegangene Sekretion und Translokation des Fusionsproteins in die Pflanzenzelle. Das rote Leuchten der Zellkerne konnte nur in Zellen beobachtet werden, die eindeutig von einem Appressorium, meist direkt an den Zellkernen, penetriert wurden. Bei Kontrollinfektionen mit dem Stamm ASGFP war hingegen keine solche Fluoreszenz zu beobachten, auch wenn Appressorien die Zellen penetrierten (Abb. 5.32 c).

Das Protein SP7 aus *G. intraradices* konnte somit erfolgreich in *M. oryzae* exprimiert werden. Dieses Experiment diente desweiteren auch als finaler Beweis, der erfolgreichen Sekretion von SP7 und ergänzte so die Ergebnisse des YSSTs und der vorangegangenen Lokalisationsstudien in *M. truncatula* und *N. benthamiana*. Durch Modifikation des Zwiebelhäutchen Tests, konnte eine neue Methode zur einfachen Überprüfung der Lokalisation potentieller Effektorproteine etabliert werden. Besonders für genetisch nur schwer zugängliche Organismen, wie AM-Pilzen, stellt dieses System eine hervorragende Ergänzung zur Untersuchung Pathogenitäts bzw. Symbiose relevanter Gene.

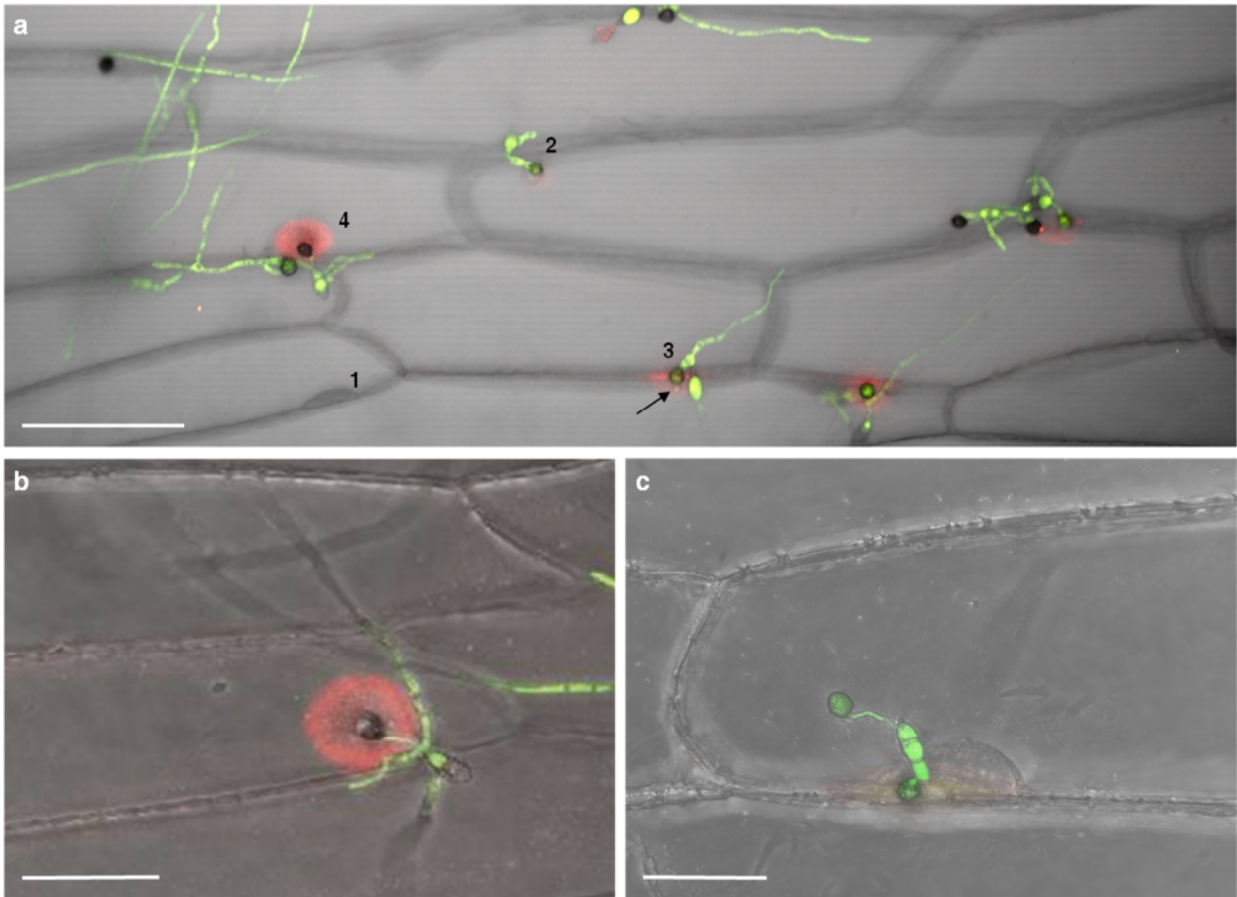


5.31 Verifizierung der Transformation des *M. oryzae* Stammes ASGFP

Oben: Binäres Vektorkonstrukt, das verwendet wurde für die Transformation von ASGFP zur Expression von SP7-mRFP unter der Kontrolle des konstitutiven ToxA Promotors. Die Hybridisierungszonen der für die Southern Blot Analyse verwendeten Sonden SP7 und BASTA sind eingezeichnet.

Unten: Southern Blot Analyse von drei transformierten Stämmen (ASGFP-SP7-mRFP1-3) und von zwei Kontrollstämmen, dem Parentalstamm ASGFP und dem BASTA-resistenten Δ erl1. Nur die Transformanten 1 und 3 erwiesen sich als echte Transformanten mit Insertionen von SP7 sowie der BASTA-Kassette.

5 Ergebnisse



5.32 Erfolgreicher *in vivo* SP7 Sekretionsassay in *M. oryzae* ASGFP

Die Expression von SP7-mRFP erfolgte unter Kontrolle des ToxA Promotors im grün-fluoreszierenden *M. oryzae* Stamm ASGFP.

(a,b) Akkumulation von SP7-mRFP in den Zellkernen von penetrierten Zwiebelepidermiszellen. Bei den dunklen Punkten handelt es sich um die melanierten Appressorien von *M. oryzae*. (1-4) Allmähliche Zunahme der roten Fluoreszenz durch SP7-mRFP: (1) uninfizierte Zelle, (2) junges Appressorium, (3) junge invasive Hyphe (Pfeil) (4) abgeschlossene Effektortranslokation.

(c) Keine rote Fluoreszenz der Nuklei ist zu beobachten, wenn der Infektionsassay mit dem Parentalstamm AS-GFP durchgeführt wird.

Bei den Aufnahmen handelt es sich um Maximalprojektionen mehrerer konfokaler Ebenen. Die Größenbalken repräsentieren je 10 μm .

Um nun die Folgen der Expression von SP7 im Verlaufe der Infektion mit dem Pathogen *M. oryzae* zu untersuchen wurden Reispflanzen mit Hyphen des Stammes AS-GFP bzw. der SP7-exprimierenden Stämme SP7-mRFP-1 und SP7-mRFP-3 infiziert. Hierzu wurden Hyphen der jeweiligen Stämme auf einer Cellophan-Membran auf Fåhraeus-Schrägagarplatten ausgebracht. Nach zwei Tagen wurden gekeimte Reissamen auf dem Agar platziert und für eine Woche mit den Pilzen koinkubiert. Zur Beurteilung der Stärke der Infektion wurden Fotos der Pflanzenwurzeln angefertigt (Abb. 5.33 a) und diese von mehreren Begutachtern unabhängig voneinander und ohne Kenntnis der Identität der Proben bezüglich dem Grad der Nekrose und der Wurzellänge beurteilt (Abb. 5.33 b). Im Vergleich zur Kontrolle waren die Wurzeln der mit ASGFP infizierten Pflanzen viel kürzer und weniger entwickelt. Wurzeln hingegen, die mit den SP7-exprimierenden Stämmen infiziert wurden zeigten eine mit uninfizierten Kontrollwurzeln (Mock) vergleichbare Wurzelmorphologie. Sowohl die mit den SP7-mRFP Stämmen als auch mit ASGFP infizierten Wurzel wiesen klar ersichtlich nekrotische Bereiche, vergleichbarer Infektionsstärke auf. Jedoch, bezogen auf die Länge der Wurzel, konnte für die SP7-exprimierenden Wurzeln ein für die Pflanze günstigeres Wurzellänge/Nekrose Verhältnis statuiert werden.

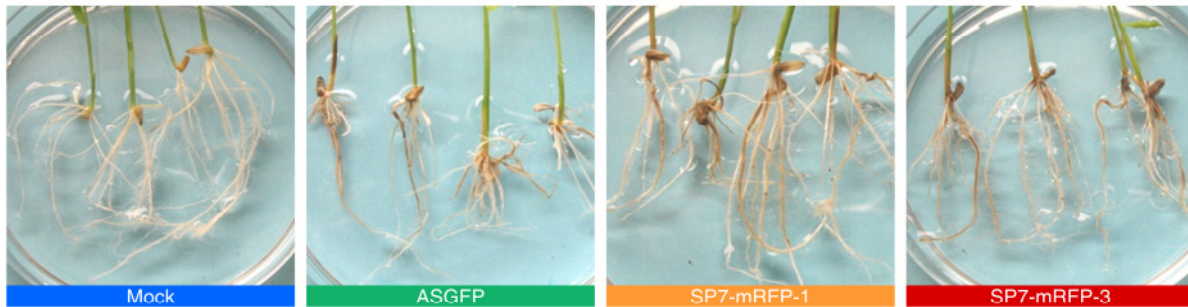
Da *M. oryzae* in erster Linie als ein Pathogen der Reisblätter bekannt ist wurden auch Reispflänzchen durch eine Sprüh-Inokulation mit Sporen der zu testenden Stämme infiziert und nach vier Tagen Blätter aller Pflanzen hinsichtlich der Stärke der Infektion bewertet. Beim Vergleich der jeweils am stärksten und am schwächsten infizierten Blätter lies sich in der Wildtyp Infektion eine leicht größere Menge nekrotischer Läsionen erkennen, als in den mit SP7-mRFP Stämmen infizierten Blättern (Abb. 5.34). Beim Vergleich aller infizierten Blätter kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen konstatiert werden. Auch bei der Untersuchung der Appressorien-Bildung auf hydrophoben Oberflächen konnten keinen wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen observiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um diese phänotypische Beobachtung auch auf dem Gen-Level zu untersuchen, wurde die Expression zweier PR10 Gene in den infizierten Pflanzenwurzeln untersucht. Die Gene *OsPR10a* und *OsPR10b* werden bekannterweise in Reis während der Infektion mit *M. oryzae* induziert (Marcel *et al.*, 2010; Plett *et al.*, 2011). Für beide Gene konnte eine klare Reduktion der Induktion im Vergleich zu den mit ASGFP- infizierten Pflanzen detektiert werden (Abb. 5.35).

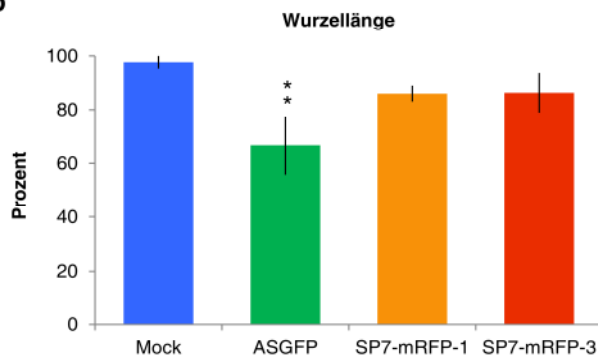
Diese Resultate deuten darauf hin, dass es sich bei SP7 tatsächlich um einen generellen Effektor handelt, der ,durch Regulation der Immunabwehr der Pflanze, eine wichtige Funktion in der Etablierung/ Beibehaltung des biotrophen Status einnimmt. Die Kenntnis eines solchen Effektorproteins, das in parasitischen Interaktionen zur Mäßigung des Wirtes führen kann, stellt eine aufregende Entdeckung dar, die auch im Bereich der nachhaltigen Landwirtschaft Anwendung finden könnte.

5 Ergebnisse

a



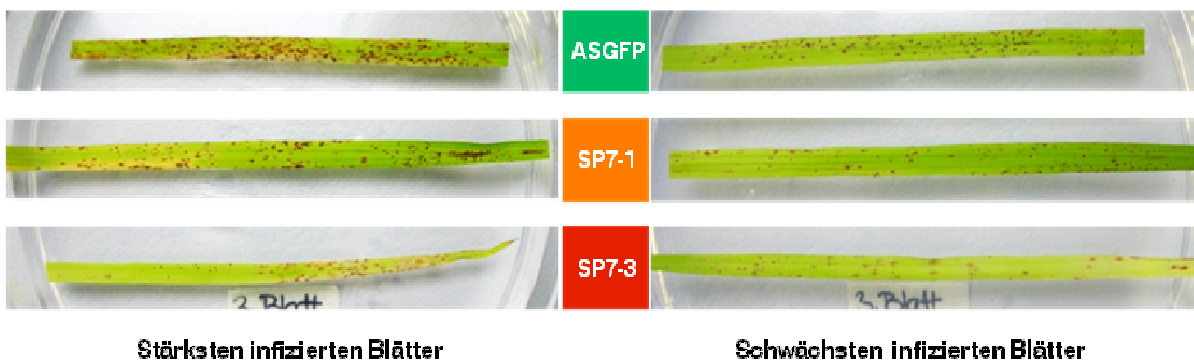
b



5.33 SP7 mildert die Symptome der Wurzelinfektion mit *M. oryzae*

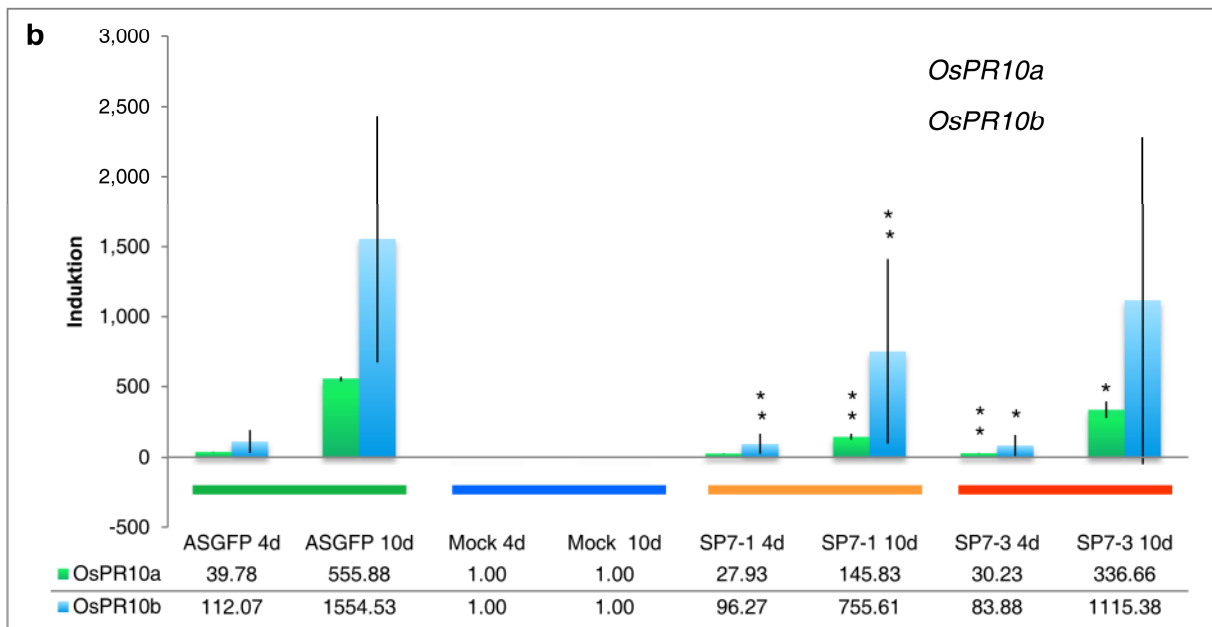
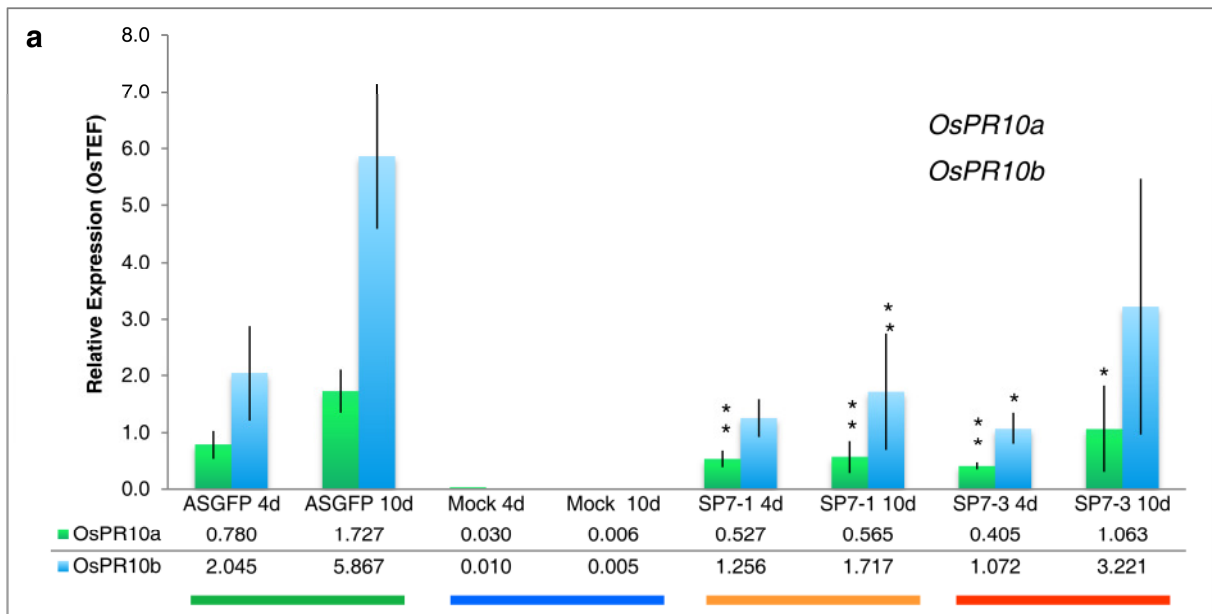
(a) Reispflanzen 10 Tage nach der Inokulation mit den SP7-exprimierenden *M. oryzae* Stämmen (SP7-mRFP-1, orange und SP7-mRFP-3, rot), dem Parentalstamm ASGFP (grün) oder der nicht-infizierten Kontrolle (blau). Im Vergleich zur Infektion mit ASGFP zeigen die Wurzeln in die SP7 transloziert wurde keine so starken Veränderungen der Wurzelmorphologie, im Besonderen der lateralen Wurzeln.

(b) Evaluierung der Länge der Reiswurzeln 10 Tage nach der Inokulation mit ASGFP (grün), SP7-mRFP-1 (orange) oder SP7-mRFP-3 (rot) im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Mock, blau). Drei biologische Replikate mit jeweils 4 Pflanzen wurden ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Mock-Probe und wird angezeigt mit ** ($p < 0.01$).



5.34 Sprühinfektion von Reisblättern mit den SP7-exprimierenden *M. oryzae* Stämmen

Nach vier Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Infektion der Blätter mit ASGFP (grün) und den Stämmen SP7-mRFP-1 (orange) und SP7-mRFP-3 (rot) festgestellt werden. Abgebildet sind die jeweils stärksten sowie schwächsten infizierten Blätter aller Testpflanzen.



5.35 Reduzierte Expression zweier Reis PR-Gene bei Expression von SP7 während des Infektionsprozesse

OsPR10a und *OsPR10b* Transkript-Akkumulation in Reiswurzeln 4 und 10 Tage nach der Infektion mit den *M. oryzae* Stämmen ASGFP (grün), SP7-mRFP-1 (SP7-1, orange) und SP7-mRFP-3 (SP7-3, rot). In den SP7-exprimierenden Stämmen konnte eine reduzierte Induktion beider PR-Gene im Vergleich zur Infektion mit dem Parentalstamm gemessen werden. In der nicht infizierten Kontrolle (Mock, blau), werden die Gene nicht exprimiert.

(a) Expressionslevel von *OsPR10a* und *OsPR10b* relativ zu *OsTEF*.

(b) Induktion von *OsPR10a* und *OsPR10b* normalisiert zu *OsTEF* und relativ zur Kontrolle.

Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung dreier biologischer Replikate. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte gegen die Expression im Stamm ASGFP mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

6 Diskussion

6.1 Sekretierte Proteine in der AM

In aktuellen Genomprojekten und Sekretomstudien konnte gezeigt werden, dass sekretierte Proteine einen beachtlichen Teil des Proteoms von pathogenen Pilzen ausmachen. Für *Ustilago maydis* konnten insgesamt 426, für *Magnaporthe oryzae* sogar 739 dem Sekretom zugehörige Gene ermittelt werden. Dies entspricht einem ungefähren Anteil von 7% des Gesamtproteoms dieser Pilze (Dean *et al.*, 2005; Kämper *et al.*, 2006). Die Anzahl der sekretierten Proteine von *M. oryzae* ist damit fast zweimal so hoch wie die des nicht pathogenen Pilzes *Neurospora crassa* (Dean *et al.*, 2005). Dies ist ein weiteres Indiz für die fundamentale Bedeutung der sekretierten Proteine bei der Interaktion von pathogenen Pilzen und ihrem Wirt. Für mutualistische Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze bietet die Sequenzierung des Ektomykorrhizapilzes *Laccaria bicolor* erste Einblicke in die Ausstattung an sekretierten Proteinen, die zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des biotrophen Status notwendig sind (Martin *et al.*, 2008). Bei *L. bicolor*, dem bisher größten sequenzierten pilzlichen Genom, konnten sogar für 2931 Proteine eine wahrscheinliche Sekretion vorhergesagt werden.

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe eines modifizierten YSST die mRNAs von 17 verschiedenen Proteinen identifiziert werden, die im Verlauf der AM-Symbiose von *G. intraradices* sekretiert werden. Diese Zahl erscheint verschwindend gering im Vergleich zu der für *L. bicolor* beschriebenen Menge zur Sekretion annotierter Proteine. Jedoch geben diese Proteine, bis das Genom von *G. intraradices* verfügbar wird, erste und einzige Auskünfte über das Sekretom eines AM-Pilzes. Durch Vergleich mehrerer cDNA-Banken, repräsentativ für verschiedene Phasen der Symbiose, war es zudem möglich einen Einblick über die Veränderungen der Zusammenstellung der sekretierten Proteine im Verlauf der AM zu erhalten. So konnte gezeigt werden, dass im Besonderen in der frühen symbiotischen Phase, in der es zur Kontaktaufnahme sowie der Etablierung der Partnerschaft kommt, eine Vielzahl an Proteinen sekretiert wird. Eine Beteiligung einiger dieser Proteine am Signalaustausch zwischen Pilz und Pflanzenwirt oder eine Rolle als pilzlicher Virulenzfaktor scheint daher sehr wahrscheinlich.

Bei der YSST-Methode zur Identifizierung sekretierter Proteine handelt es sich um einen funktionellen Screen auf cDNAs mit Signalpeptiden. Dies bietet den Vorteil, dass alle über diese Methode identifizierten Proteine direkt ihre tatsächliche Sekretion unter Beweis stellen konnten. Viele der sekretierten Proteine der oben genannten Genomstudien wurden hingegen nur aufgrund bioinformatischer Vorhersagen dem Sekretom der entsprechenden Pilze zugeteilt. Letzte Sicherheit über ihre tatsächliche Sekretion fehlt also. Mit den Klonen SP10, SP78 und SP66 konnten zudem 3 Proteine im YSST identifiziert werden, deren Sekretion nicht nach dem konventionellen Mechanismus erfolgt und für die somit bioinformatisch keine Sekretion mittels Signalpeptid prognostiziert werden kann. Durch die Proteine Avrk und

Avra10 von *Blumeria graminis* sind jedoch bereits zwei Effektoren beschrieben, deren Sekretion ebenfalls nicht über das ER erfolgt (Ridout *et al.*, 2006). Die YSST-Methode bietet somit auch die Möglichkeit solche Effektorproteine funktionell zu identifizieren.

Zusätzlich zu den 17 von *G. intraradices* isolierten mRNAs, konnten auch 4 mRNAs pflanzlichen Ursprungs isoliert werden. Alle diese Klone konnten aus der cDNA-Bank „induziert“ isoliert werden, die nur pflanzliches Material der direkten Kontaktstellen von Pilz und Pflanze enthält. Proteine der Pflanze, die in diesem Bereich exprimiert werden, könnten auch für die AM von Bedeutung sein. Unter den 4 Klonen befanden sich zwei rezeptor-ähnliche Kinasen (RLK). Viele RLKs übernehmen wichtige Funktionen in der Signalerkennung und Signalvermittlung. Ein prominentes Beispiel stellt die RLK DMI2 dar, die sowohl für die AM-Symbiose als auch die RNS eine wichtige Rolle einnimmt. Sie ist von zentraler Bedeutung im SYM-Signalweg, der nach Perzeption mikrobieller Signale schnell zur Aktivierung symbiotischer Gene führt (Stracke *et al.*, 2002). Obgleich viele Arbeitsgruppen an diesem Signalweg forschen, konnten immer noch nicht alle Komponenten der Signalkaskade entschlüsselt werden. Eine weitere RLK in einer DMI2 übergeordneten Rolle wäre hierbei durchaus denkbar. Zudem konnten Kuhn *et al.* (2010) zeigen, dass auch unabhängig von DMI2 die Perzeption pilzlicher Signale erfolgt. Ein Rezeptor der diese Signale integriert konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Die mit Abstand am häufigsten im YSST isolierte mRNA konnte einem pflanzlichen Extensin zugeordnet werden. Extensine sind Glycoproteine der Pflanzenzellwand. Verschiedenste Forschungsarbeiten deuten darauf hin, dass diese Proteine bei der Reaktion der Pflanze auf mechanische Verletzungen, sowie auf pathogenen Befall von Bedeutung sind (zusammengefasst von Bowles, 1990). Inter- und intramolekulare Vernetzungen zwischen Tyrosinresten der Moleküle resultieren in stark verflochtenen Extensin Netzwerken, die die Zellwand stärken und eine Barriere für invasive Pathogene bilden (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1997; Showalter *et al.*, 1985). Dadurch wird die Verbreitung der Pathogene bereits im Vorfeld der Aktivierung der transkriptions-abhängigen Abwehr verlangsamt (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1995). Die große Präsenz der mRNA eines Extensins in der frühen und auch späten Phase der AM, lässt auf eine hohe Expression dieser Zellwandproteine schließen. Ebenso wie Pathogene scheinen AM-Pilze die Pflanzenabwehr anzuregen was im Aufbau dieser ersten Barriere resultieren könnte. Diese Annahme entspricht dem Befund, dass es in der frühen Phase der AM zu der Auslösung einer transienten Abwehr- und Stressreaktion von Seiten der Pflanze kommt (Spanu *et al.*, 1989, Bonanomi *et al.*, 2001, García-Garrido und Ocampo, 2002; Liu *et al.*, 2003). Umso notwendiger erscheint es, dass der Pilzpartner diesen Reaktionen zeitnah z.B. durch Effektorproteine entgegenwirken kann. Wie diese Klone zeigen lässt sich die YSST-Methode somit auch einsetzen um für die Symbiose interessante Proteine des Pflanzenpartners zu identifizieren.

Für viele der isolierten, von *G. intraradices* sekretierten Proteine konnten in der NCBI Datenbank keine homologen Proteine identifiziert werden bzw. nur Proteine mit einem relativ niedrigen Maß an Homologie zugeordnet werden (E-Wert >1). Auch die Suche nach bekannten Domänen, die Rückschlüsse auf die Funktion dieser Proteinen geben könnte, verlief oft erfolglos. Dies kann in manchen Fällen auf die nur kurzen, vorhandenen cDNA Sequenzen

6 Diskussion

zurückzuführen sein, die mittels des YSST isoliert werden konnten. Doch auch für *L. bicolor* konnte nach der Sequenzierung für 67% der sekretierten Proteine keine Funktion zugeordnet werden. Von diesen Proteinen wiederum konnten 82% als spezifisch für den Ektomykorrhizapilz eingeordnet werden (Martin *et al.*, 2008). Daher ist es wahrscheinlicher, dass es sich auch bei den unbekanntem, sekretierten Proteinen von *G. intraradices* um spezifische Proteine des AM-Pilzes handelt, die sehr spezielle Aufgaben in der AM übernehmen und z.B. die Etablierung des biotrophen Status gewährleisten.

6.2 Die SP7-Proteinfamilie - Eine neuartige Familie potentieller Effektorproteine

Die Proteine SP7, SP14, und SP31 sowie das chimäre Protein c118621 können aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu einer Proteinfamilie zusammengefasst werden. Dieser konnten bisher keine homologen Proteine außerhalb von *G. intraradices* zugeordnet werden. Diese Tatsache spricht für eine spezifische Rolle dieser Proteine in der Ausbildung der Symbiose zwischen *G. intraradices* und seinen Wirtspflanzen.

Effektorproteine prokaryotischer und eukaryotischer Pathogene weisen typischerweise einen modularen Aufbau aus mehreren Domänen auf mit einer N-terminalen Domäne, die zur Sekretion befähigt und einer oder mehreren C-terminalen, funktionellen Einheiten (Sory *et al.*, 1995; Mudgett *et al.*, 1997; Rosenbrock *et al.*, 2007). Dieser Aufbau lässt sich auch bei den Mitgliedern der SP7-Proteinfamilie beobachten. Hinter dem N-terminalen SP findet sich eine kurze konservierte Region unbekannter Funktion, dann jeweils ein NLS und ein durch Sequenzwiederholungen ebenfalls modular gegliederter C-Terminus. Hierbei fällt auf, dass im Besonderen die Bereiche des Signalpeptids, der Region unbekannter Funktion und des NLS hoch konserviert sind, während die C-terminalen Bereiche sich zwar in dem häufigen Vorkommen der Aminosäuren Asp, Tyr und Lys, jedoch nicht in ihrer Sequenz gleichen. Gene, die für Effektoren kodieren sind erwartungsgemäß vorrangige Ziele der evolutionären Kräfte, die die Koevolution zwischen Wirt und Pflanze vorantreiben (Ma und Guttman, 2008). Tatsächlich haben sich viele Effektorgene im Vergleich zu anderen Genen der Pathogenen durch positive Selektion beschleunigt weiterentwickelt und zeigen signifikant höhere Raten der synonymen, sowie nicht-synonymen Nukleotid Substitution (Allen *et al.*, 2004; Dodds *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2007). Bei modularen Effektorproteinen stehen hierbei die verschiedenen Domänen unter unterschiedlichem Selektionsdruck. Domänen die der Sekretion, Translokation oder Lokalisation im Wirt dienen sind davon weniger betroffen, als die Module, die für die Effektorwirkung verantwortlich sind (Stavrinos *et al.*, 2006; Ma und Guttman, 2008; Win *et al.*, 2007). Die SP7-Familie könnte somit auf ein ursprüngliches Gen zurückzuführen sein, das sich, im Laufe der Koevolution mit den Pflanzen, schnell weiterentwickelt hat und so in den heutigen, bisher vier verschiedenen Proteinen resultierte. Weiterhin weisen diese Beobachtungen an pathogenen Effektorproteinen darauf hin, dass der C-terminale Repeatbereich der Familienmitglieder für die jeweilige Effektorfunktion von Bedeutung ist. Für die anderen Proteindomänen hingegen sind vielmehr Aufgaben in der Übertragung des Proteins von Pilz zu Pflanze bzw. dort, in der Positionierung am pflanzlichen Zielort des Ef-

fektors vorstellbar. Möglich wäre somit dass, nach Sekretion der Proteine mit Hilfe des SPs, die kurze Domäne unbekannter Funktion für die Translokation der Effektorproteine in die Pflanze verantwortlich ist, von wo aus sie durch das NLS in den Pflanzenkern transportiert werden. Bisher wurden allerdings noch keine Untersuchungen vorgenommen, die diese These stützen könnten. Denkbar wäre jedoch eine Mutation oder Deletion dieses kurzen Bereiches zum Beispiel durch *Site-Directed. Mutagenesis*. Durch anschließende *in planta* Expression des resultierenden Proteins fusioniert mit GFP könnte die Bedeutung dieser Region für Translokation und Lokalisation der Proteine aufgeklärt werden.

Generell ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr wenig über den Mechanismus der Translokation der Effektorproteine filamentöser Pilze in ihre Wirtspflanzen bekannt. Im Gegensatz zu bakteriellen Effektoren, die durch das Typ III Sekretionssystem direkt in den Wirt injiziert werden, müssen die Effektorproteine von Pilzen und Oomyzeten durch einen anderen Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden. Für letztere konnte eine konserviertes Motiv (RXLR) beschrieben werden, das für die Translokation der Effektorproteine notwendig und hinreichend ist (Whisson *et al.*, 2007). Die Existenz ähnlicher konservierter Domänen in filamentösen Pilzen konnte bisher jedoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit der Aufnahme des SP7 Proteins in die Zelle bestünde durch rezeptor-vermittelte Endozytose. Der Befund, dass einige Pilz- und Oomyzeten- Effektoren durch Binden des Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI-3-P) der Zelloberflächen transloziert werden können steht derzeit noch unter reger Diskussion. Vermittelt werden soll diese Rezeptorbindung durch Variationen des RXLR-Motivs in den Effektorproteinen (Kale *et al.*, 2010). Während einer persönlichen Kommunikation mit Brett Tyler, dem korrespondierenden Autor dieser Publikation, deutete dieser auf vergleichbare Motive auch in der Sequenz von SP7 hin.

Interessanterweise weisen die Repeats von SP7 eine schwache Ähnlichkeit mit dem Hämolyysin-artigen calcium-bindenden Repeatmotiv auf. Dieses Motiv kann ebenso beim Protein NodO von *Rhizobium leguminosarum* vorgefunden werden. Dieses Protein ist in der Lage Poren in der Zytoplasmamembran von Leguminosen zu formen, wodurch es bei der Perzeption der Nod Faktoren assistiert (Economou *et al.*, 1990, Economou *et al.*, 1994; Sutton *et al.*, 1994). Die Antwort auf die Frage nach der Aufnahme von SP7 in die Zelle, könnte also, trotz des geringen Konservationsgrades in den Repeats selbst zu finden sein. Wie Abb. 5.2 b zeigt weisen die Repeats von SP31, trotz der unterschiedlichen Sequenz, den gleichen hydrophilen Charakter, und somit eine ähnliche Struktur auf wie die Repeats von SP7. Sollte der Schlüssel zur Translokation von SP7 also tatsächlich in der Zusammensetzung seines C-Terminus zu finden sein, wird dieser Mechanismus höchstwahrscheinlich auch für SP31 funktionieren.

6.3 SP7 - das erste Effektorprotein in der AM-Symbiose

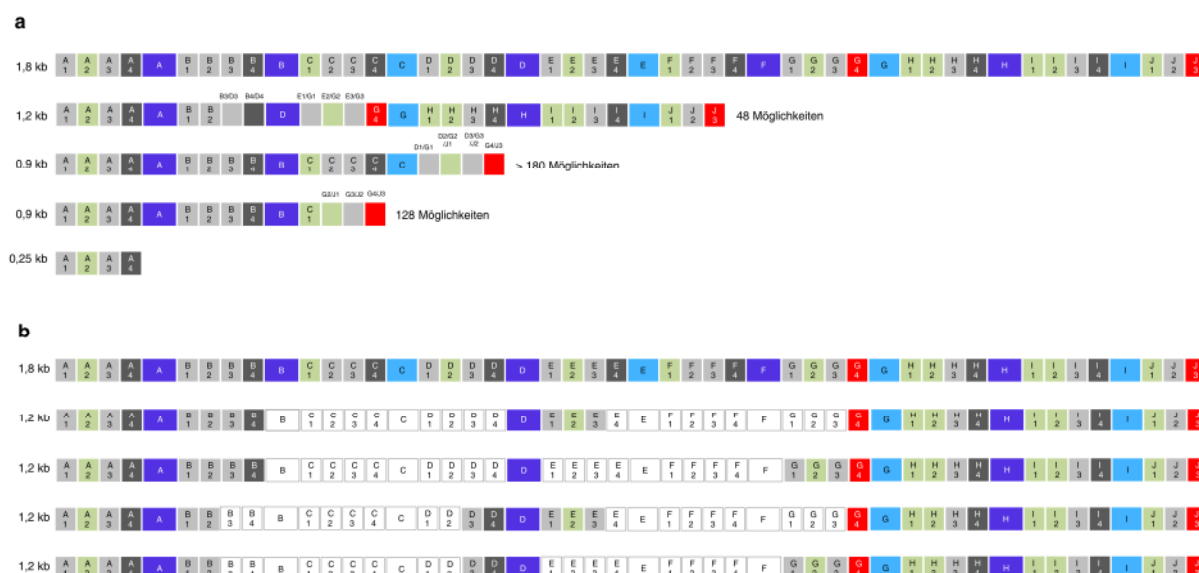
Bei der Etablierung der AM-Symbiose wird im Gegensatz zu den meisten Pathogen-Wirt-Interaktionen nur eine leichte und transiente Abwehrreaktion der Pflanze induziert (Spanu *et al.*, 1989; Bonanomi *et al.*, 2001; García-Garrido und Ocampo, 2002; Liu *et al.*, 2003). Ein Effektorprotein, das in diesen Prozess regulierend eingreift, sollte daher bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Symbiose aktiv sein, um die Kolonisierung der Pflanze durch den Pilz zu ermöglichen. Weiterhin sollte es aber auch zu einem späteren Zeitpunkt der AM exprimiert werden, um durch eine dauerhafte Unterdrückung der pflanzlichen Abwehrreaktion zur Etablierung des biotrophen Status beizutragen.

Im YSST konnte das Protein SP7 aus allen getesteten cDNA-Banken isoliert werden und zeigte somit Präsenz zu allen Phasen der AM-Symbiose. Dieses erste Anzeichen für eine fast konstitutive Expression während der Symbiose konnten durch detaillierte Real-Time PCR Analysen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass auch ohne Kontakt zur Pflanze eine leichte Induktion von SP7 vorliegt, aber erst in räumlicher Nähe zu einem Wirt eine deutliche Induktion erfolgt. Aus evolutionärer Sicht macht dies durchaus Sinn, da die Kosten der Proteinproduktion eingespart werden, bis das Protein akut benötigt wird. Dennoch ist immer eine geringe Menge des Effektors vorhanden und dieser somit jederzeit schnell verfügbar. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang zu überprüfen ob die Induktion von SP7 den direkten Kontakt mit der Wirtspflanze benötigt oder ob ein diffusibles Signal der Wirtspflanze ausreicht. Getestet werden könnte dies durch eine einfache Separierung der Interaktionspartner durch einen Cellophanmembran (Kuhn *et al.*; 2010). Bei einem solchen Experiment könnten zum Vergleich auch Wurzeln einer nicht-Wirtspflanze getestet werden, um AM-spezifische von allgemeinen pflanzlichen Signalen zu unterscheiden. *In planta* zeigte sich die höchste Induktion von SP7 während der AM. Auch im Wirt scheint das Protein also notwendig zu sein um den Fortbestand der Symbiose zu sichern.

Eine überaus interessante Entdeckung bei der Untersuchung der Expression des SP7 Proteins stellte der Befund da, dass verschiedene, in ihrer Repeat-Zusammenstellung variierende, Versionen des Proteins aus den verschiedenen cDNA-Banken isoliert werden konnten. Eine detaillierte Southern Blot Analyse dieses Sachverhaltes konnte zudem aufzeigen, dass die Verteilung dieser Versionen nicht gleichmäßig ist, sondern in den verschiedenen Entwicklungsphasen der AM unterschiedliche SP7-Populationen bevorzugt werden. Die längste theoretisch mögliche Version (1,8 kb) scheint hierbei eine Sonderstellung einzunehmen, denn sie lässt sich zu jedem Zeitpunkt der Symbiose detektieren. Denkbar wäre also, dass diese Version für die Grundfunktion des SP7-Proteins notwendig ist und in Abhängigkeit der Entwicklungsphase von den kürzeren Populationen unterstützt wird. Inwieweit dieses für jede Wirtspflanze in gleichem Maße zutrifft, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wäre aber, in Anbetracht des enormen Wirtsspektrums der AM-Pilze ein sehr interessantes Experiment.

Das Protein SP7 zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der SP7-Proteinfamilie durch seine klar strukturierten Repeats aus und wurde auch deshalb für weitere Studien ausgewählt. Nur durch diese Eigenschaft des Proteins war es so möglich, die verschiedenen SP7-Populationen miteinander und mit der gDNA zu vergleichen und die fehlen-

denden Bereiche zu identifizieren. Konventionelle Intron-Exon-Grenzen ließen sich nur im Bereich des Signalpeptids auffinden, wo sie zur Entfernung einer 68s bp Introns während des klassischen Spleißvorgangs beitragen. Für den Rest des Proteins konnten jedoch trotz intensiver Bemühungen keine eindeutigen alternativen Spleißstellen festgelegt werden, die jede Version erklären könnten. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass die verschiedenen Versionen auf alternatives Spleißen nach einem *Exon-Skipping* ähnlichen Mechanismus zurückzuführen sind (Abb. 6.1).



6.1 Alternatives Spleißen führt zu den verschiedenen SP7 Populationen

Die SP7 Populationen 1,2 kb, 0,9 kb, 0,8 kb und 0,25 kb lassen sich durch alternatives Spleißen mit unkonventionellen Spleißstellen aus der gDNA/1,9 kb Version gewinnen. Eine genaue Lokalisation der Spleißstellen ist jedoch nicht möglich. Farblich gleiche Blöcke repräsentieren gleiche Sequenzfolgen innerhalb der Repeats (vgl. Abb. 5.4). Nur bei im Innern beschrifteten Blöcken lässt sich eindeutig nachverfolgen auf welchen Repeat der 1,9 kb Population sie zurückzuführen sind.

(a) Nicht alle Sequenzfolgen können einer ursprünglichen Position in der 1,9 kb Population zugewiesen werden. Die Spleißstellen müssen sich in den Bereichen dieser nicht eindeutig zuordenbaren Sequenzwiederholungen befinden. Der potentielle Ursprung dieser Blöcke ist über den Blöcken notiert und die Anzahl der sich daraus ergebenden Kombinationen steht hinter der jeweiligen Sequenz geschrieben.

(b) Für die 1,2 kb-Population sind 4 der theoretisch möglichen 48 Kombinationen an Repeats dargestellt, die diese Population ergeben würden und nicht durch genaue Sequenzanalyse ausgeschlossen werden konnten. Die in den jeweiligen Versionen gespleißten Teile sind weiß dargestellt. Die genaue Position der Spleißstellen, lässt sich somit unmöglich vorhersagen.

Aufgrund der sehr hohen Identität zwischen SP14 und SP31 könnten auch diese beiden Proteine verschiedene Spleißvarianten ein und derselben mRNA sein. Da die Repeatstruktur dieser Proteine aber wesentlich unüberschaubarer ist als die von SP7, konnte dies bisher nicht geklärt werden, obgleich die genomische Sequenz von SP31 bekannt ist (Bachelorarbeit Ruben Betz). Unbekannt ist bislang auch noch, welche Population bzw. Mindestlänge des SP7 Proteins zur Entfaltung seiner Effektorwirkung notwendig ist. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden solche Untersuchungen jedoch bereits initiiert. Klar scheint allerdings, dass eine solch komplexe Proteinstruktur eng mit der Funktion des Proteins innerhalb der Zelle in Verbindung steht.

Im Allgemeinen können Effektorproteine die im Apoplasten wirken und intrazellulär aktive Effektoren unterschieden werden. Extrazelluläre Effektorproteine zeichnen sich häufig durch eine cysteinreiche Struktur aus. Dieser Aufbau ermöglicht die Ausbildung zahlreicher Disulfidbrücken, die zur Stabilisierung des Proteins im proteasenreichen Apoplasten beitragen

6 Diskussion

sollen (van den Hooven *et al.*, 2001). Da dies bei SP7 nicht der Fall ist und auch der Logik eines NLS widersprechen würde, handelt es sich bei SP7 sehr wahrscheinlich um ein intrazellulär wirkendes Protein. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden verschiedene Lokalisationsstudien mit dem potentiellen Effektor durchgeführt.

Durch das Fehlen eines stabilen Transformationssystems für *G. intraradices* wurde die subzelluläre Lokalisation von SP7 in verschiedenen heterologen Systemen überprüft. Eine ausschließlich nukleäre Lokalisation des Proteins innerhalb der Pflanze wurde durch ektopische Expression von SP7-GFP (inklusive SP) in *M. truncatula* Wurzeln nachgewiesen. Dass dieser Lokalisation von SP7 dessen Sekretion und Wiederaufnahme durch die Pflanzenzelle vorausging, konnte durch Bestätigung der Funktionalität des SPs gezeigt werden: Signalpeptide sind im Allgemeinen zwischen verschiedenen Spezies in ihrer Funktionalität hoch konserviert (Gilmore, 1993). Durch den YSST konnte bereits gezeigt werden, dass das SP von SP7 auch in Hefe zur Sekretion des Proteins über das ER befähigt. Bei diesem Sekretionspfad, werden die Proteine in Vesikel verpackt und via Exozytose nach außen abgegeben. Bei Expression von SP7-GFP in *N. benthamiana* ließen sich im GFP-Kanal solche Vesikel erkennen, die in der DsRed1 Kontrolle nicht auftraten. Es handelte sich dabei also sehr wahrscheinlich um sekretorische Vesikeln in die das Fusionsprotein im ER zur Abgabe in den Apoplasten verpackt wurde. Eben solche Vesikel konnten auch bei der Expression von SP_(SP7)-GFP, dem Signalpeptid von SP7 fusioniert an GFP, detektiert werden. Die Lokalisation von SP_(SP7)-GFP war zudem vergleichbar mit der von SP_(PR1)-GFP, einem pflanzlichen Protein, dessen tatsächliche Sekretion in *N. benthamiana* als verlässlich angenommen werden kann. Einen letzten Beweis für die Funktionalität des SP von SP7 konnte durch die *in vivo* Sekretion des Proteins im *M. oryzae*-Zwiebelhäutchen gegeben werden. Aufgrund der erwiesenen Sekretion von SP7 durch die Pflanzenzelle kann jedoch eine Lokalisation des Proteins im Zellkern derselben nur nach einer erneuten Aufnahme des Proteins erfolgen. Dieser Eintritt in die Pflanzenzelle geschah im Falle der ektopischen Expression in der Pflanze unabhängig von der Präsenz anderer pilzlicher Faktoren, so dass gefolgert werden kann, dass SP7 alleine in der Lage ist seine Aufnahme in die Wirtszelle zu vermitteln. Nach der Translokation in die Pflanzenzelle wird SP7 dann mit Hilfe des NLS in den Pflanzenzellkern transportiert. Die Funktionalität des NLS wurde zusätzlich durch Expression von SP7-GFP in dem filamentösen Ascomyzeten *A. nidulans* bestätigt. In diesem System konnte SP7 ohne SP eindeutig im Zellkern des Pilzes observiert werden. Alle diese Resultate können als hinreichender Beweis der Sekretion, eigenständigen Translokation und Kernlokalisierung von SP7-GFP aufgefasst werden und bestätigen somit die Rolle des Proteins als pilzlicher Effektor.

Überraschenderweise konnte bei der Expression *in planta* keine eindeutige Lokalisation für SP7 Δ SP-GFP beobachtet werden, sondern eine Verteilung des Proteins in der Zelle ähnlich der DsRed1-Kontrolle. Eine Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass in diesen Proben, durch die fehlende Sekretion des Proteins, die intrazelluläre Konzentration des GFP-Fusionsprotein so hoch ist, dass es, wie bei Überexpressionen öfter zu beobachten ist, auch zu artifiziellen Lokalisationen kommen kann. Für viele Proteine sind post-translationale Modifikationen zur Erfüllung ihrer vollen Aktivität essentiell. Sekretierte Proteine werden direkt im ER und im Golgi-Apparat auf verschiedenste Weise modifiziert. Das fehlende Durchlaufen

des ER-gebundenen Sekretionspfads könnte sich somit auf die Funktionalität des NLS oder des ganzen SP7 Δ SP Proteins auswirken. Ohne funktionelles Lokalisationssignal würde sich das Protein, ebenso wie DsRed1, im Zytoplasma verteilen und in den Zellkern diffundieren. Diese Theorie widerspricht aber dem erfolgreichen Nachweis von SP7 Δ SP im Zellkern von *A. nidulans*. Die nicht eindeutige subzelluläre Lokalisation des Proteins in *M. truncatula* ist somit vermutlich tatsächlich als ein Artefakt der Überexpression zu erachten.

Erste Hinweise auf eine tatsächliche Effektorwirkung von SP7 konnten bei der Mykorrhizierung der SP7-exprimierenden *M. truncatula* Wurzeln gemacht werden. Bei allen getesteten SP7-GFP und SP7 Δ SP-GFP Linien konnte eine im Vergleich zu Kontrollwurzeln signifikant erhöhte Kolonisierung der Wurzeln durch *G. intraradices* ermittelt werden. In den SP7 Δ SP-GFP Linien war der Effekt sogar noch deutlicher zu beobachten als in den SP7-GFP Wurzeln. Dies ist vermutlich auch ein Effekt der höheren Effetorkonzentration in diesen Zellen, resultierend aus der fehlenden Sekretion des Proteins. Zu beachten bleibt bei diesem Experiment, dass in den Kontrollwurzeln zwar SP7 nicht von der Pflanze selbst produziert wird, jedoch selbstverständlich auch das während der Kolonisation von *G. intraradices* sekretierte SP7 aktiv ist. In den transgenen SP7-exprimierenden Linien kommt es zu einer Vermischung der Proteine aus beiden Quellen. Um die Bedeutung von SP7 für die AM genau definieren zu können, wäre es daher äußerst interessant die Mykorrhizierung ohne SP7 Expression zu untersuchen. Bisher ist es nicht möglich einen Knock-Out des Proteins in *G. intraradices* herzustellen. Doch die in Nowara *et al.* (2010) beschriebene Methode des *Host Induced Gene Silencing* (HIGS) könnte in diesem Zusammenhang wirkungsvoll eingesetzt werden. Diese Methode basiert auf dem engen Kontakt von Wirt und Mikroorganismus während dem nicht nur Nährstoffe sondern auch mRNAs ausgetauscht werden (Westwood *et al.*, 2009). RNAi-Konstrukte, die auf pilzliche Transkripte abzielen können so zunächst im Wirt exprimiert werden. Von dort gelangen sie durch den mRNA-Austausch zwischen den Partnern auch in den Pilz, wo sie ihre Wirkung entfalten können. In unserer Arbeitsgruppe konnte diese Methode bereits erfolgreich für AM-Pilze eingesetzt werden (Nicole Helber, im Druck). Daher wurde auch im Rahmen dieser Arbeit ein solches Konstrukt für SP7 konstruiert. Das Konstrukt beinhaltet einen Repeat des SP7-Proteins und wurde mittels Agrobakteriell-vermittelter Transformation in *M. truncatula* exprimiert. Erste Tests auf das Expressionslevel von SP7 in diesen Linien bei Kolonisation mit *G. intraradices* konnten jedoch keine eindeutige Reduktion der SP7 Transkriptmenge belegen (Daten nicht gezeigt). Ein zweites Konstrukt, das einen größeren Teil von SP7 umfasst, wurde bereits angefertigt, konnte allerdings noch nicht getestet werden.

6.4 Durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MtERF19 untergräbt SP7 die Abwehrreaktion der Pflanze

Um fortführend die Rolle von SP7 im Verlauf der AM zu entschlüsseln wurde eine Y2H Analyse durchgeführt, wobei das Effektorprotein als Bait eingesetzt wurde. Besonderes Interesse weckte hierbei der Befund, dass es sich gleich bei drei der potentiellen Interaktionspartner von SP7 (SP7-R1, SP7-R2, SP7-R6) um RNA-bindende Proteine handelte, für deren Homologe eine Beteiligung am Prozess des alternativen Spleißens nachgewiesen ist (Golovkin und Reddy, 1999; Mayeda *et al.*, 1999; Zolotukhin *et al.*, 2001). In verschiedenen Studien konnte bereits der Einsatz von alternativem Spleißen als Regulationsmechanismus einiger Resistenzgene (R Gene) nachgewiesen werden (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Halterman *et al.*, 2003; Ferrier-Cana *et al.*, 2005; Zhang und Gassmann, 2007).

Pflanzliche R Gene erkennen Effektorproteine oder deren Auswirkungen und lösen im Folgenden die effektivere zweite Linie der Pflanzenabwehr aus, die häufig in einer *Hypersensitive response* und damit im lokalen Zelltod der Pflanze resultiert. Da die Expression dieser Gene dadurch aber auch schädlich für die Pflanzen sein kann, muss der Prozess der Aktivierung streng und auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Der Mechanismus des alternativen Spleißens stellt eine solche regulatorische Ebene dar.

In Abhängigkeit des R Gens können die alternativen Transkripte die Expression der R Gene entweder reduzieren oder für verkürzte R Proteine codieren, die sich förderlich auf die Aktivierung der Abwehrreaktion auswirken (Gassmann, 2008). Durch Interaktion mit Komponenten des alternativen *Spleißosoms* könnte SP7 regulatorisch in diesen Prozess eingreifen und entweder die Induktion der Abwehrreaktion durch die R-Proteine verhindern oder die Erkennung anderer pilzlicher Proteine durch die R Proteine unterbinden.

Viele RNA-binde Proteine weisen ebenso wie SP7 einen modularen Aufbau auf, bestehend aus zahlreichen Repeats einfacher Bindedomänen. Durch diese Konstruktionsweise kann RNA mit einer höheren Spezifität gebunden werden, was im Besonderen bei den nur schwach konservierten Spleißstellen eukaryotischer mRNA von Bedeutung ist (Perez *et al.*, 2003; Deka *et al.*, 2005; Sickmier *et al.*, 2006, Lunde *et al.*, 2007). Die Repeatstruktur von SP7 könnte somit perfekt auf die Struktur der RNA-bindenden Proteine abgestimmt sein. Andererseits könnte aber natürlich auch diese Ähnlichkeit im Aufbau zu einer fälschlichen Interaktion während des Y2H Screens geführt haben. Bei einer, im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführten Interaktionsstudie mit SP31 als Bait, wurde interessanterweise auch der Klon SP7-R6 als Interaktionspartner identifiziert (Bachelorarbeit Ruben Betz). In der gleichen Arbeit konnte auch eine schwache Interaktion von MtERF19 und SP31 nachgewiesen werden. Für SP7 und SP31 konnte Ruben Betz aber keine direkte Interaktion im Y2H-Screen aufzeigen. Bisher wurden weder für SP7 noch für SP31 weiterführende Untersuchungen zur Verifizierung der jeweiligen Interaktionen durchgeführt.

Im Gegensatz dazu konnte die Interaktion von SP7 mit MtERF19 mittels BiFC in *N. benthamiana* bereits bestätigt werden. Dieser Befund schließt dennoch eine weitere Interaktion von SP7 mit den RNA-bindenden Proteinen oder anderen Klonen der Y2H-Analyse nicht aus. Ein

einzelnes Effektorprotein kann durchaus an mehreren Stellen in der Pflanze aktiv sein. Der Effektor AvrRpt2 von *Pseudomonas syringae* beispielsweise zeigt sich proteolytisch wirksam gegen fünf Proteine von *Arabidopsis thaliana* (Chisholm *et al.*, 2005; Takemoto und Jones, 2005). Sollte SP7 zudem nur eine transiente Interaktion mit einem andern pilzlichen oder pflanzlichen Protein ausbilden, kann diese Interaktion mit der Y2H Methode vermutlich nicht detektiert werden. Durch den Einsatz anderer Methoden zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen, wie z.B. *pulldown*/ Ko-Immunpräzipitation Experimenten könnten die Ergebnisse des ersten Y2H-Screen bestätigt und vervollständigt werden.

Der Transkriptionsfaktor MtERF19 konnte aufgrund der hoch konservierten N-terminalen MCGGAIL/L Domäne eindeutig der Klasse IV der ERF Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. Für viele Mitglieder dieser Familie wurde eine durch pathogenen Befall induzierte Expressionszunahme experimentell ermittelt (Tournier *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Während der Infektion von *M. truncatula* Wurzeln mit dem pflanzenpathogenen Ascomyzeten *C. trifolii* konnte in dieser Arbeit auch für MtERF19 eine starke pathogenitäts-abhängige Induktion verzeichnet werden. Im klaren Gegensatz dazu wurde im Verlauf der Mykorrhizierung von *M. truncatula* mit *G. intraradices* zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Hochregulation der *MtERF19* Expression beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass es den AM-Pilzen möglich sein muss der Induktion des Transkriptionsfaktors entweder aktiv gegen zu steuern oder diese durch eine Art Maskierung zu vermeiden. MtERF19 könnte einen Ansatzpunkt einer aktiven Manipulation der transkriptionellen Aktivierung der Immunantwort des Wirtes durch den Pilz darstellen.

Dennoch wäre es interessant zu erfahren, welches MAMP als Auslöser der Signalkaskade wirkt, die schließlich zur Induktion von *MtERF19* führt. Die Entdeckung dieser Substanz und des dazugehörigen PRRs, würden unser Verständnis der Signalaustauschprozesse während der AM entscheidend bereichern. Bisher sind nicht sehr viele pilzliche MAMPs beschrieben. Neben Chitin (Felix *et al.*, 1993), dem wohl bekanntesten pilzlichen MAMP, wurden auch Ergosterol (Granado *et al.*, 1995) und N-glykosilierte Hefe-Peptide (Basse und Boller, 1992) als solche PTI-induzierende Signalstoffe bekannt. Wie in Ramonell *et al.* (2002) aufgezeigt wurde, führt die Perzeption von Chitin sehr schnell zur Aktivierung der, durch dieses MAMP induzierten Transkriptionsfaktoren. Da in dieser Arbeit aber demonstriert werden konnte, dass das Expressionsmuster von *MtERF19* nicht der typischen Antwort auf Chitin entspricht, erfolgt die Induktion des Transkriptionsfaktors sehr wahrscheinlich durch eine andere pilzliche Substanz. Bestätigt wurde diese Annahme zusätzlich durch die fehlende Aktivierung der Expression von *MtERF19* in *M. truncatula* Pflänzchen bei Zugabe von Krabbenpanzer-Chitin oder Chitotetraose. Allerdings konnte für die Chitinperzeption gezeigt werden, dass die Länge der Chitinfragmente nicht ohne Bedeutung ist und zu lange Fragmente erst nach der Prozessierung durch pflanzliche Chitinasen von den Rezeptoren erkannt werden. Mit Avr4 von *Cladosporium fulvum* wurde sogar ein Effektorprotein beschrieben, dass diesen Sachverhalt ausnutzt und durch Schutz der langen Chitinketten vor Chitinasen deren Spaltung und somit die Entstehung und Erkennung kürzerer Fragmente durch die entsprechenden PRRs verhindert (van den Burg *et al.*, 2006; de Jonge *et al.*, 2010). Sollte *MtERF19* zudem nicht das di-

6 Diskussion

rekte Target der durch Chitin induzierten Signalkaskade sein, ließe sich auch die Verzögerung in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors im Zellextrakt-Experiment erklären.

Ergosterol ist als Bestandteil der Zellmembran in den meisten Pilzen vorzufinden. Interessanterweise ist dies jedoch nicht in AM-Pilzen der Fall, die stattdessen Campesterol aufweisen, ein Sterol, das auch in Pflanzen vorkommt (Fontaine *et al.*, 2001). Ob sich diese unterschiedliche Membran Komposition in der Aktivierung von MtERF19/PR10b bemerkbar macht, wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit begonnen zu erforschen. Hierzu wurden *M. truncatula* Pflänzchen jeweils für 6 h und 24 h entweder mit Ergosterol, Campesterol, Stigmasterol oder Sitosterol inkubiert und die Expression von *MtERF19* ermittelt. Hierbei traten aber so große Variationen zwischen den verschiedenen technischen Replikaten auf, dass keine klaren Schlussfolgerungen aus den Daten gezogen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise führte bei der Durchführung dieses Experiment die schlechte Löslichkeit einiger Sterole zur Applikation von nicht einheitlichen Konzentrationen dieser Stoffe zu den Pflanzen. Sollte es gelingen dieses Problem zu lösen, sind weitere Testreihen geplant.

Anstelle von pilzlichen MAMPs wäre es theoretisch auch denkbar, dass die Induktion der *MtERF19* aktivierenden Signalkette auf endogene Faktoren zurückzuführen ist. Solche DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) könnten bei der Penetration der Wurzeln durch die AM-Pilze freigesetzt werden. Denkbar wären hier bekannte DAMPs wie z.B. Bestandteile der pflanzlichen Zellwand (Darvill und Albersheim, 1984) oder das Peptid-Hormon Systemin, welches bei leichten Verletzungen der Zellen abgesondert wird (zusammengefasst von Boller, 2005). Die Theorie der *MtERF19*-Aktivierung in Folge einer DAMP-induzierten Signalkaskade kann jedoch nicht der alleinige Mechanismus sein, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt, da in diesem Versuch trotz fehlender Mikroverletzungen der Pflanzen in allen Fällen eine Expressionssteigerung von *MtERF19* zu messen war.

Auch wenn also bisher nicht geklärt werden konnte welches oder welche PAMPs/DAMPs zur Induktion von *MtERF19* führen, so ließ sich dennoch ermitteln, dass auch AM-Pilze eine PTI in ihren Wirtspflanzen auslösen. Die Fehlende Induktion von *MtERF19* im Verlauf der AM-Symbiose muss somit auf eine aktive Suppression dieser durch den Pilz zurückzuführen sein. Ein hoch interessantes Resultat in diesem Zusammenhang brachte das Infektionsexperiment von SP7-exprimierenden *M. truncatula* Wurzeln mit *C. trifolii* hervor. In diesen Linien konnte eine drastisch reduzierte Induktion von MtERF19 gemessen werden, was alleinig auf die Wirkung von SP7 zurückgeführt werden kann. Die Interaktion von SP7 und MtERF19 scheint sich damit regulierend auf die Expression von MtERF19 auszuwirken. Da während dieses Experiments außer SP7 keine anderen AM-pilzlichen Proteine zu gegen waren, lässt dies außerdem darauf schließen, dass neben der Translokation von SP7 auch die Effektorfunktion des Proteins unabhängig von anderen *G. intraradices* Proteinen vollzogen werden kann. Weiterhin lässt dieser Befund vermuten, dass die Unterbindung der MtERF19-Induktion während der AM auf die Aktivität von SP7 in der Wirtswurzel zurückgeführt werden kann.

C. trifolii ist ein kompatibles Pathogen für *M. truncatula*, jedoch nicht für das in dieser Arbeit eingesetzte Kultivar Jemalong A17. Die Resistenz gegenüber *C. trifolii* wird in *M. truncatula*

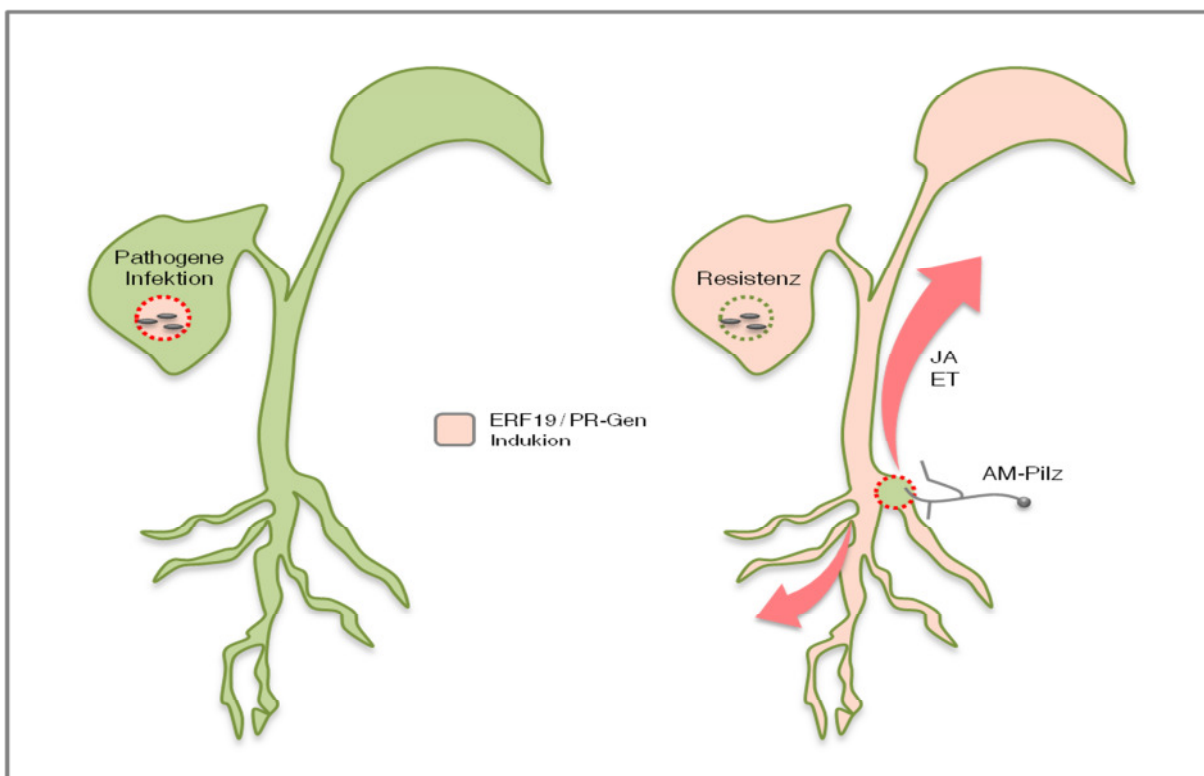
durch das Gen *RCT1* verliehen (Yang *et al.*, 2008). In dem resistenten Kultivar A17 kommt es bereits sehr schnell nach der initialen Penetration des Pathogens zu einer Abwehrreaktion von Seiten der Pflanze. Dem Pilz ist es dadurch nicht möglich die Pflanze zu besiedeln. Es liegt eine so genannte *nonhost resistance* (NHR) vor. Ausgelöst wird diese, wenn das Pathogen nicht in der Lage ist die basale durch MAMPs oder DAMPs initiierte Pflanzenabwehr zu unterbinden (Zipfel, 2008; Hein *et al.*, 2009). Die Resistenz von *M. truncatula* gegen *C. trifolii* ist begleitet von der Produktion von ROS, der lokalen Akkumulation fluoreszierender Verbindungen und der Induktion der Expression von Abwehrgenen (Torregrosa *et al.*, 2004). Erst die NHR von A17 gegenüber *C. trifolii* ermöglicht somit die Untersuchung der Auswirkungen der Expression von *SP7* und *MtERF19* auf die Induktion von Abwehrgenen der Pflanze. Ein kompatibles Pathogen wäre vermutlich in der Lage die Induktion der Abwehrgene von sich aus zu unterdrücken.

Wie in Torregrosa *et al.* (2004) für *M. truncatula* Blätter beschrieben, konnte das Abwehrgen *MtPR10b* durch die Infektion mit *C. trifolii* auch in *M. truncatula hairy root*-Linien stark induziert werden. Im Falle einer direkten oder indirekten Abhängigkeit der Induktion dieses Gens von *MtERF19*, sollte sich auch die Expression von *SP7* regulatorisch auf die Expression des Abwehrgens auswirken. Tatsächlich gelang es in dieser Arbeit zu demonstrieren, dass in den *SP7*-exprimierenden *hairy root*-Linien nur eine abgeschwächte Induktion von *MtPR10b* erfolgt. Damit konnte bewiesen werden, dass durch die Interaktion mit *SP7*, die *MtERF19*-abhängige Pflanzenabwehr abgemildert wird. Eine solche Manipulation der Pflanzen-Immunantwort sollte sich positiv auf die pilzliche Kolonisation der Wirtspflanze während der AM-Symbiose auswirken. Um diese These zu überprüfen wurden *MtERF19* RNAi- sowie Überexpressionslinien konstruiert und mit *G. intraradices* inokuliert. In der Tat führte die Reduktion der *MtERF19* Transkriptmenge durch RNAi zu einer beschleunigten Kolonisation der *M. truncatula* Wurzeln. Dieses Ergebnis entspricht somit dem Mykorrhizierungsphänotyp bei *SP7*-exprimierenden Wurzellinien und bestätigt die vorangegangene Arbeitshypothese. Im Gegenzug wurde bei der Überexpression von *MtERF19* tatsächlich ein deutlich negativer Effekt auf das Voranschreiten der pilzlichen Kolonisation ermittelt.

Bei Überexpressionsexperimenten mit einigen ERF Transkriptionsfaktoren der Klasse IV konnte eine erhöhte Resistenz der Pflanzen gegenüber verschiedenen abiotischen Stressfaktoren, sowie gegen Infektionen durch pathogene Mikroorganismen aufgezeigt werden (Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Mit den Überexpressionslinien von *MtERF19*, konnte im Rahmen dieser Arbeit bisher kein solches Infektionsexperiment durchgeführt werden, da trotz mehrerer Versuche, kein kompatibles Pathogen für *M. truncatula* Jemalong A17 zur Verfügung gestellt werden konnte. Dennoch liegt der Verdacht nahe, dass auch bei *MtERF19*-Überexpressionslinien eine gesteigerte Resistenz gegenüber Pathogenen vorliegen könnte, wie das folgende Modell zeigen soll: Durch nutzbringende Mikroorganismen des Bodens, wie z.B. AM-Pilze oder auch Rhizobakterien, kann in Pflanzen die so genannte *induced systemic resistance* (*ISR*) ausgelöst werden. Die Perzeption der MAMPs dieser Mikroorganismen bewirkt in der Pflanze eine leichte systemische Aktivierung der Abwehrreaktion (Bakker *et al.*, 2007; Van Wees *et al.*, 2008). Dies hat ein Priming der Pflanze

6 Diskussion

und eine verbesserte Resistenz gegenüber pathogenem Befall zur Folge. Vermittelt wird die ISR hauptsächlich durch die Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) -abhängigen Signalwege (Conrath et al., 2006; Van Wees et al., 2008). Für das nächste Homolog von MtERF19, den Transkriptionsfaktor LjERF19, konnte eine Induktion durch eine kombinierte Anwendung von JA und ET nachgewiesen werden (Asamizu et al., 2008). Zudem konnte dem MtGEA entnommen werden, dass auch MtERF19 durch Zugabe von Methyl-Jasmonaten stark induziert wird. Eine ISR, ausgelöst durch die Besiedelung einer Pflanze mit *G. intraradices*, könnte somit zu einer JA- und ET-vermittelten systemischen Induktion von MtERF19 und damit zusammenhängend von MtPR10b führen. Für die Pflanze hätte dies eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen zur Folge. Für den AM-Pilz hingegen bliebe die systemische, ebenso wie die lokale, durch MAMPs ausgelöste Induktion von MtERF19 folgenlos, da er durch Sekretion von SP7 dieser gegenwirken kann (Abb. 6.2).



6.2 Model der erhöhten Resistenz in AM-Pflanzen durch systemische MtERF19 Expression

MtERF19 wird über zwei Signalwege induziert, die entweder die lokale oder die systemische Resistenz gegenüber Pathogenen verbessern.

Links: Die MAMP-induzierte Aktivierung von MtERF19 führt zur lokalen Induktion einer Abwehrreaktion gegen Pathogene Mikroorganismen.

Rechts: Die systemische Induktion von MtERF19 über JA + ET führt zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Pathogenen. Der AM-Pilz *G. intraradices* kann durch Sekretion des Effektorproteins SP7 die MtERF19 induzierte Abwehrreaktion der Pflanze umgehen. Die Ausbreitung der AM-Symbiose wird somit nicht negativ beeinflusst.

6.5 SP7 - ein universelles Effektorprotein

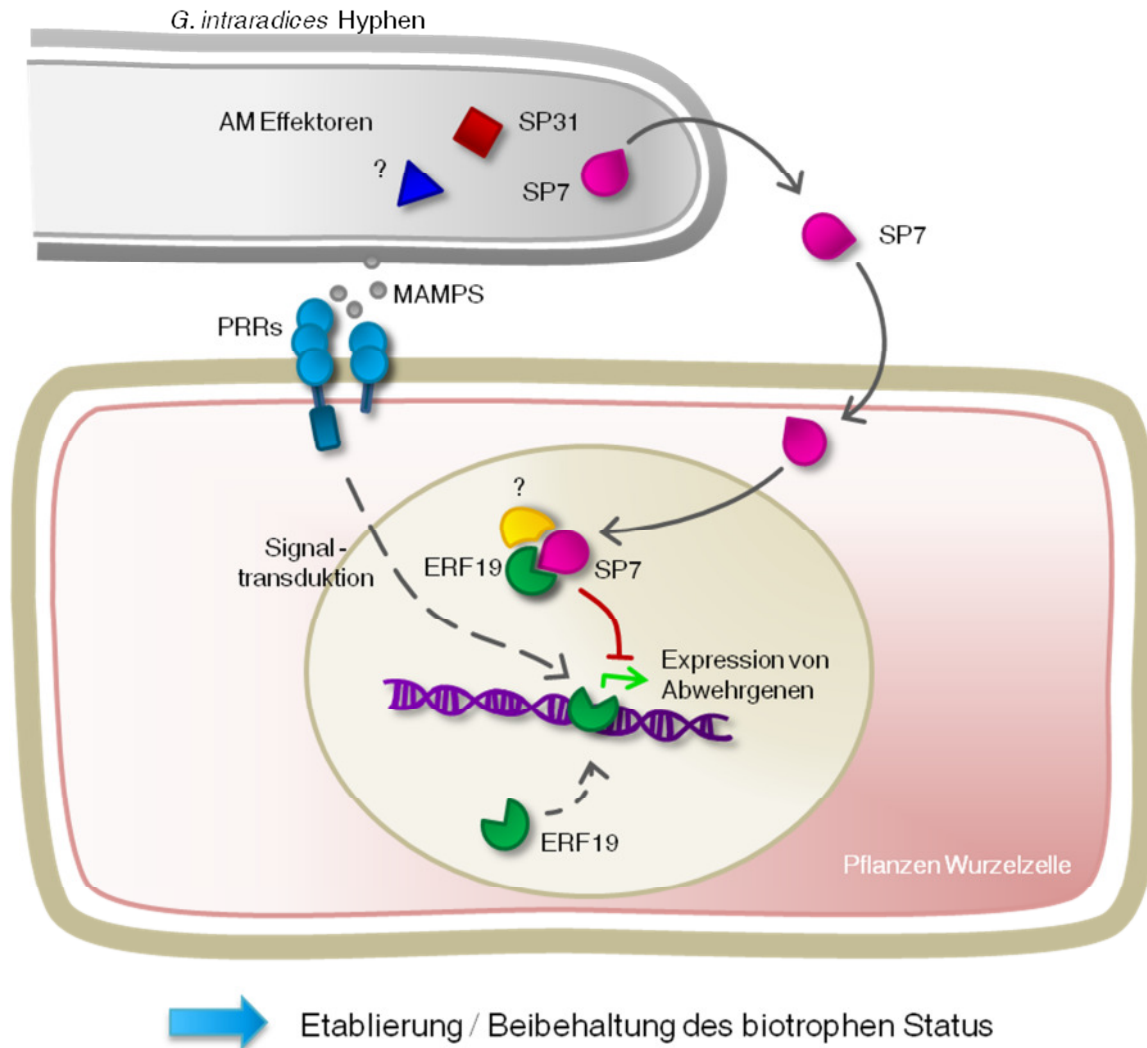
Die Suche nach Effektorproteinen zählt in den letzten Jahren zu den *hot topics* auf dem Forschungsgebiet der Mikroben-Pflanzen-Interaktionen. Während die ersten bekannten Effektorproteine von Bakterien und Oomyzeten isoliert wurden, ist es der intensiven Forschungsarbeit vieler Arbeitsgruppen zu verdanken, dass nun langsam auch unser Wissen über Effektorproteine in Pilz-Pflanzen-Interaktionen stetig steigt (zusammengefasst in de Witt *et al.*, 2009). Beim Vergleich der aus diesen Arbeiten resultierenden Veröffentlichungen fällt auf, dass nur wenige der charakterisierten Effektorproteine sich in ihrer Wirkung gleichen und für fast jedes Pilz-Pflanze-System neue Wirkmechanismen und Effektorfunktionen entdeckt werden. Dies ist sicherlich auf die lange Koevolution von Effektoren und ihren korrespondierenden R Genen zurückzuführen, die im allgemein anerkannten *Zig-Zag-Model* beschrieben wird (Jones und Dangl, 2006). Vermutlich auch bedingt dadurch, weisen viele Pathogene ein relativ eng begrenztes Wirtsspektrum auf. bzw. zeigen sich die meisten Pflanzen resistent gegenüber der Aktivität vieler pathogener Effektorproteine. Im klaren Kontrast dazu kann die AM-Symbiose von über 80 % aller Landpflanzen mit verschiedensten AM-Pilzen ausgebildet werden. AM-Pilze müssen daher entweder über eine sehr große Menge an Effektorproteinen verfügen oder ihre Effektorproteine müssen ihre Wirkung in vielen unterschiedlichen Pflanzen entfalten können. Eine weitere Möglichkeit bestände in einer großen Variabilität der einzelnen Effektorproteine, wie sie z.B. durch alternatives Spleißen erreicht werden könnte.

Inwieweit SP7 auch in anderen Pilz-Pflanze Interaktionen als Effektorprotein wirken kann, wurde im *M. oryzae-Reis* Pathosystem getestet. Hierbei konnte eine erstaunliche Beobachtung gemacht werden: Reiswurzeln, die mit transgenen, SP7-exprimierenden *M. oryzae* Stämmen infiziert wurden, zeigten einen abgemilderten Infektionsphänotyp im Vergleich zu Pflanzen, die mit dem Kontroll *M. oryzae* Stamm infiziert wurden. Dieser Befund überrascht, da die für das Effektorprotein SP7 nachgewiesene Immun-supprimierende Funktion erwartungsgemäß eher in einer gesteigerten Infektion der Pflanzen durch *M. oryzae* resultieren sollte. *M. oryzae* ist ein hemibiotropher Pilz, der kurze Zeit biotroph in der Pflanze wächst, dann aber den Wechsel zur nekrotrophen Lebensweise vollzieht. Die durch SP7 induzierte Milderung der Abwehrreaktion der Pflanze, könnte dem Pilz die Möglichkeit verschaffen, seine biotrophe Phase auszuweiten und den Switch zur nekrotrophen Phase zu verschieben.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte basiert die Effektorwirkung von SP7 in *M. truncatula* auf der Interaktion des Proteins mit dem Transkriptionsfaktor MtERF19. Für andere Wirtspflanzen wurden bisher keine Studien durchgeführt. Die Familie der AP2/ERF Transkriptionsfaktoren ist eine große Proteinfamilie, die es nur im Pflanzenreich gibt. Die Expansion der Familie ist vermutlich auf Genduplikationen zurückzuführen sowie anschließenden evolutionären Veränderungen der Proteine (Gutterson und Reuber, 2004). Wie für andere Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde sind funktionelle Domänen von solchen evolutionären Ereignissen weniger betroffen wie die restlichen Teile der Proteine (Anusha *et al.*, 2003). Dies führte dazu, dass außerhalb der konservierten Domänen auch die Transkriptionsfaktoren der Klasse IV, zu denen MtERF19 zählt, eher wenig konserviert sind. Eine Interaktion

6 Diskussion

von SP7 mit Homologen von MtERF19 in anderen Pflanzen ist daher am wahrscheinlichsten an diesen stark konservierten Bereichen zu erwarten, wobei die AP2-Domäne bereits ausgeschlossen werden konnte. Eine andere Möglichkeit besteht in der Interaktion über strukturell konservierte Bereiche. Über die Proteinstruktur von SP7 ist bisher nichts bekannt. Der außergewöhnliche Aufbau der Repeats aber lässt auf eine spezifische Proteinstruktur schließen, die im Zusammenhang mit einer möglichen Interaktion stehen könnte.



6.3 Model der SP7 Effektorfunktion

Pflanzenzellen erkennen pilzliche MAMPs bereits zu frühen Zeitpunkten der Symbiose. Die Perzeption dieser Substanzen durch *pattern recognition receptors* (PRRs) aktiviert eine Signalkaskade die in der Expression des Transkriptions *MtERF19* resultiert. *MtERF19* wiederum aktiviert durch die Induktion des *PR10b* Gens die Abwehrreaktion der Pflanze. *G. intraradices* wirkt dieser Reaktion durch die Sekretion von Effektorproteinen wie SP7 (und SP31) entgegen. SP7 transloziert zum Pflanzenzellkern, interagiert dort mit *MtERF19* (und eventuell anderen unbekannt Proteinen), wodurch die Immunantwort der Pflanze unterdrückt wird. Dies ermöglicht es den AM-Pilz den biotrophen Status zu etablieren.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse können zu folgendem Modell der Effektorwirkung von SP7 zusammengefasst werden: Wird ein bisher unbekanntes MAMP der AM-Pilz durch die entsprechenden *pattern recognition receptors* (PRRs) der Wirtspflanze erkannt, resultiert dies in einer Signaltransduktionskaskade die zur Induktion der PTI führt. In Folge dieser wird auch der Transkriptionsfaktor *MtERF19* induziert der weiterführend für die Akti-

vierung pflanzlicher Abwehrgene, wie dem PR10b Gen sorgt. Durch Sekretion des Effektorproteins SP7 kann der AM-Pilz G. intraradices dieser Abwehrreaktion entgehen. Das Protein transloziert in die pflanzliche Zelle und interagiert im Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor MtERF19. Die Beteiligung anderer Proteine an dieser Interaktion kann bisher nicht ausgeschlossen werden. Durch die Wechselwirkung von SP7 und MtERF19 wird die abwehrinduzierende Wirkung von MtERF19 gehemmt und die Abwehrreaktion der Pflanze gestoppt. Den AM-Pilzen ist es dadurch möglich ihren biotrophen Status zu etablieren.

6.6 Fazit und Perspektive

AM-Pilze existieren seit 400 Millionen Jahren morphologisch unverändert auf unserem Planeten und können daher getrost als lebende Fossilien bezeichnet werden. Schon evolutionär früh trennte sich der Stamm der Glomeromycota von den anderen Pilzstämmen ab. Aus diesem Grund wurde lange Zeit angenommen, dass die AM-Pilze keine der Mechanismen übernommen haben, die Pathogene zur Manipulation ihrer Wirtspflanzen nutzen.

In dieser Arbeit jedoch konnte mit SP7 das erste Effektorprotein in der AM-Symbiose entdeckt und charakterisiert werden. Dies beweist, dass auch die mutualistisch symbiontischen AM-Pilze Effektorproteine sekretieren, die der Manipulation ihrer Pflanzenpartner dienen und dadurch die Etablierung der Symbiose ermöglichen. Diese Erkenntnisse könnten maßgeblich zum Verständnis der Prozesse beitragen, die für die Anpassung des Pilzes an die Pflanze und den Fortbestand der nützlichen Interaktion unabdinglich sind. Dadurch könnte diese Arbeit möglicherweise den Weg für einen verbesserten Einsatz von AM-Pilzen in der nachhaltigen Landwirtschaft ebnen.

Nichtsdestotrotz bleiben viele Fragen bezüglich der Effektorfunktion von SP7 noch offen und bieten interessante Ansatzpunkte für weitere Analysen. Von besonderem Interesse wäre es mehr über transkriptionelle Veränderungen im Wirt zu erfahren, die durch die Expression von SP7 ausgelöst werden. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen sind Microarray Analysen bei induzierbarer Expression von *SP7* geplant. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es, ausgelöst durch verschiedenen Pilzextrakte, zu einer PTI-vermittelten Induktion von *MtER19* kommt. Es konnte jedoch nicht eindeutig die Substanz bzw. die Substanzen identifiziert werden, die diese Induktion auslösen. Durch Modifikation der Pilzextrakte mit Chitinasen/Glukanasen, detailliertere Zeitreihen Experimente und verschiedenen Konzentrationen bei der direkten Zugabe potentieller PAMPs könnte der aktuelle Kenntnisstand schnell vorangetrieben werden.

Bisher gelang es SP7 als ersten auch in Arbuskeln exprimierten Effektor zu isolieren. Über weitere Effektorproteine in arbuskel-haltigen Geweben ist bisher nichts bekannt, doch gerade arbuskel-spezifische Effektoren hätten großes Potential die Genexpression in den arbuskelhaltigen Kortezellen zu manipulieren und Einfluss auf den Austausch von Nährstoffen zu nehmen (Skibbe *et al*, 2010). Durch Optimierung der Gewinnung dieses schwer zugänglichen symbiotischen Materials, könnte in einem erneuten YSST mehr über diese spezialisierten Proteine erfahren werden.

7 Literaturverzeichnis

Akiyama K, Matsuzaki K-ichi, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827.

Alfalfa benefits from Medicago trun... [Proc Natl Acad Sci U S A. 2008] - PubMed - NCBI.

Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL. 2004. Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew. *Science (New York, N. Y.)* **306**: 1957-1960.

Ameline-Torregrosa C, Cazaux M, Danesh D, Chardon F, Cannon SB, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B, Young ND, Samac DA, Hugué T, u. a. 2008. Genetic Dissection of Resistance to Anthracnose and Powdery Mildew in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 61-69.

Ane J-M. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* **303**: 1364-1367.

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller Thomas, Ausubel FM, Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.

Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, Tabata S, Sato S. 2008. A Positive Regulatory Role for LjERF1 in the Nodulation Process Is Revealed by Systematic Analysis of Nodule-Associated Transcription Factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **147**: 2030-2040.

Ausubel FM. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**: 973-979.

Badel JL, Charkowski AO, Deng WL, Collmer A. 2002. A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. tomato Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **15**: 1014-1024.

Bakker PAHM, Pieterse Corné M J, van Loon LC. 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239-243.

Basse CW, Boller T. 1992. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells: N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. *Plant Physiology* **98**: 1239-1247.

BÉCARD G, FORTIN JA. 1988. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.

Becard G, Piche Y. 1989. Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2320-2325.

Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L. 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.

Bittel P, Robatzek S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 335-341.

Blancaflor EB, Zhao L, Harrison M J. 2001. Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* **217**: 154-165.

Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker D G. 2001. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **14**: 695-700.

- Boller Thomas. 2005.** Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 116-122.
- Boller Thomas, Felix Georg. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379-406.
- Bonanomi A, Oetiker JH, Guggenheim R, Boller Thomas, Wiemken A, Vögeli-Lange R. 2001.** Arbuscular Mycorrhiza in Mini-Mycorrhizotrons: First Contact of *Medicago truncatula* Roots with *Glomus intraradices* Induces Chalcone Synthase. *New Phytologist* **150**: 573-582.
- Bonfante Paola, Requena N. 2011.** Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 451-457.
- Bowles DJ. 1990.** Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* **59**: 873-907.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992.** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C. 1994.** Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *The Plant Cell* **6**: 1703-1712.
- Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R.L. (2000).** Biochemistry and molecular biology of plants, Rockville, MD, USA: American Society of Plant Biologists
- Bucher M, Wegmüller S, Drissner D. 2009.** Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 500-507.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000.** The Pre-Symbiotic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is Induced by a Branching Factor Partially Purified from Plant Root Exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 693-698.
- Burd CG, Dreyfuss G. 1994.** Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)* **265**: 615-621.
- Campos-Soriano L, García-Garrido JM, San Segundo B. 2010.** Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The New Phytologist* **188**: 597-614.
- Carvalho LM, Correia PM, Martins-Loução MA. 2003a.** Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. *Mycorrhiza* **14**: 165-170.
- Chabot, Bécard G., Piché Y. 1992.** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz Brian J. 2006a.** Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814.
- Chisholm ST, Dahlbeck Douglas, Krishnamurthy N, Day B, Sjolander K, Staskawicz Brian J. 2005.** Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2087-2092.
- Colditz F, Braun H-P, Jacquet C, Niehaus K, Krajinski F. 2005.** Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches*-tolerance of *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* **59**: 387-406.
- Colditz F, Niehaus K, Krajinski F. 2007.** Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta* **226**: 57-71.
- Conrath U. 2006.** Systemic Acquired Resistance. **1**: 179-184.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse Corné M J, Poinssot B, Pozo María J, u. a. 2006.** Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **19**: 1062-1071.

7 Literaturverzeichnis

Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens - Annual Review of Phytopathology, 43(1):205.

Cooper KM, Losel DM. 1978. Lipid Physiology of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. I. Composition of Lipids in Roots of Onion, Clover and Ryegrass Infected with *Glomus mosseae*. *New Phytologist* **80**: 143-151.

Cordier C, Pozo M. J., Barea JM, Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1017-1028.

Dalpé, De Souza FA, Declerck S. 2005. Life Cycle of *Glomus* Species in Monoxenic Culture. 49-71.

Dangl J L, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.

Darvill AG, Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**: 243-275.

Davies Jr FT, Potter JR, Linuerman RG. 1993. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration - response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum* **87**: 45-53.

Dean Ralph A, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu J-R, Pan H, u. a. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980-986.

Dehne H, Schoenbeck F. The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. 1.Colonization of tomato plants by *Fusarium oxysporum* T. sp. *lycopersici*. *Phytopathol.Z.*, 95:105–110, 1979.

Deka P, Rajan PK, Perez-Canadillas JM, Varani G. 2005. Protein and RNA dynamics play key roles in determining the specific recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human Cstf-64 protein. *Journal of Molecular Biology* **347**: 719-733.

Demchenko K, Winzer T, Stougaard J, Parniske M, Pawlowski K. 2004. Distinct Roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in Root Colonization and Arbuscule Formation. *New Phytologist* **163**: 381-392.

Dias AP, Braun EL, McMullen MD, Grotewold E. 2003. Recently Duplicated Maize R2R3 Myb Genes Provide Evidence for Distinct Mechanisms of Evolutionary Divergence after Duplication. *Plant Physiology* **131**: 610 -620.

Dickson S, Smith SE. 2001. Cross Walls in Arbuscular Trunk Hyphae Form after Loss of Metabolic Activity. *New Phytologist* **151**: 735-742.

Dinesh-Kumar SP, Baker BJ. 2000. Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1908-1913.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews. Genetics* **11**: 539-548.

Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8888-8893.

van der Does HC, Lievens B, Claes L, Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep Martijn. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology* **10**: 1475-1485.

Dufresne M, Perfect S, Pellier A-L, Bailey John A., Langin T. 2000. A GAL4-like Protein Is Involved in the Switch between Biotrophic and Necrotrophic Phases of the Infection Process of *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. *Plant Cell* **12**: 1579-1590.

Durrant WE, Dong X. 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209.

- Economou A, Davies AE, Johnston AWB, Downie J. A. 1994.** The *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* nodO gene can enable a nodE mutant of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to nodulate vetch. *Microbiology* **140**: 2341-2347.
- Economou A, Hamilton WD, Johnston AW, Downie J A. 1990.** The *Rhizobium* nodulation gene nodO encodes a Ca²⁺(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *The EMBO Journal* **9**: 349-354.
- Eitas TK, Dangl Jeffery L. 2010.** NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 472-477.
- Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ. 2007.** The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 326-331.
- Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GB. 2002.** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962-966.
- Esquerré-Tugayé MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touzé A. 1979.** Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions: II. Evidence for the Accumulation of Hydroxyproline-rich Glycoproteins in the Cell Wall of Diseased Plants as a Defense Mechanism. *Plant Physiology* **64**: 320-326.
- Ezawa T, Hayatsu M, Saito M. 2005.** A New Hypothesis on the Strategy for Acquisition of Phosphorus in Arbuscular Mycorrhiza: Up-Regulation of Secreted Acid Phosphatase Gene in the Host Plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1046-1053.
- FAHRAEUS G. 1957.** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**: 374-381.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999.** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **18**: 265-276.
- Felix Georg, Regenass M, Boller Thomas. 1993.** Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**: 307-316.
- Ferrier-Cana E, Macadré C, Sévignac M, David P, Langin T, Geffroy V. 2005.** Distinct post-transcriptional modifications result into seven alternative transcripts of the CC-NBS-LRR gene JA1tr of *Phaseolus vulgaris*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* **110**: 895-905.
- Ferrol N, Pozo María José, Antelo M, Azcón-Aguilar C. 2002.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1683-1687.
- Figueiredo JFL, Römer P, Lahaye T, Graham JH, White Frank F, Jones JB. 2011.** Agrobacterium-mediated transient expression in citrus leaves: a rapid tool for gene expression and functional gene assay. *Plant Cell Reports*.
- Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Hartmann M-A, Sancholle Michel. 2001.** Sterol biosynthesis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* **36**: 1357-1363.
- Frey B, Buser HR, Schöpp H. 1992.** Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils* **13**: 229-234.
- García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1377-1386.
- Gassmann W. 2008.** Alternative Splicing in Plant Defense. In: Reddy ASN, Golovkin M, Hrsg. Nuclear pre-mRNA Processing in Plants. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 219-233.
- Genre A., Bonfante P. 1997.** A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. *Protoplasma* **199**: 30-38.
- Genre A., Bonfante P. 1998.** Actin versus Tubulin Configuration in Arbuscule-Containing Cells from Mycorrhizal Tobacco Roots. *New Phytologist* **140**: 745-752.
- Genre Andrea, Chabaud Mireille, Faccio A, Barker David G, Bonfante Paola. 2008.** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal

7 Literaturverzeichnis

fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell* **20**: 1407-1420.

Genre Andrea, Chabaud Mireille, Timmers T, Bonfante Paola, Barker David G. 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell Online* **17**: 3489 -3499.

Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S. 2000. Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* **211**: 609-613.

Gianinazzi-pearson V, Dumas-gaudot E, Gollotte A, Alaoui a. T, Gianinazzi S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**: 45-57.

Gianinazzi Silvio, Gollotte A, Binet M-N, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*.

Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S. 1990. In vitro enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus by root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* **7**: 243–255.

Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.

Gietz RD, Woods RA. 2006. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **313**: 107-120.

Gilmore R. 1993. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* **75**: 589-592.

Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS. 1993. Factors Affecting Appressorium Development in the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytologist* **123**: 115-122.

Glazebrook J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.

Golovkin M, Reddy ASN. 1999. An SC35-like Protein and a Novel Serine/Arginine-rich Protein Interact with Arabidopsis U1-70K Protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36428 -36438.

Gómez-Gómez L, Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**: 1003-1011.

González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* **130**: 317-323.

Granado J, Felix G., Boller T. 1995. Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiology* **107**: 485-490.

Grandmouginferjani A, Dalpe Y, Hartmann M, Laruelle F, Sancholle M. 1999. Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* **50**: 1027-1031.

Gray J, Massa D, Boucot AJ. 1982. Caradocian land plant microfossils from Libya. *Geology* **10**: 197-201.

Green NE, Graham SO, Schenck NC. 1976. The Influence of pH on the Germination of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Spores. *Mycologia* **68**: 929-934.

Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Wang TL, u. a. 2010. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant Cell* **22**: 2509-2526.

Güimil S, Chang H-S, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, u. a. 2005. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of re-

- sponse to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8066-8070.
- Guo H, Ecker JR. 2004.** The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 40-49.
- Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, Schmelzer E. 1998.** Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 8398-8403.
- Gutterson N, Reuber TL. 2004.** Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 465-471.
- Halterman DA, Wei F, Wise RP. 2003.** Powdery mildew-induced Mla mRNAs are alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiology* **131**: 558-567.
- Harrison Maria J. 1999.** MOLECULAR AND CELLULAR ASPECTS OF THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL SYMBIOSIS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 361-389.
- Harrison Maria J., Buuren ML van. 1995.** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Harrison Maria J., Dewbre Gary R., Liu J. 2002.** A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell Online* **14**: 2413 -2429.
- Helber N, Requena N. 2008.** Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New Phytologist* **177**: 537-548.
- Heupel S, Roser B, Kuhn H, Lebrun M-H, Villalba Francois, Requena N. 2010.** Erl1, a novel era-like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **23**: 67-81.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun Sophien. 2009a.** Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **22**: 115-122.
- van den Hooven HW, van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, de Wit PJGM, Vervoort J. 2001.** Disulfide Bond Structure of the AVR9 Elicitor of the Fungal Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a Cystine Knot†. *Biochemistry* **40**: 3458-3466.
- Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Pat Cerretti D, Urdal DL, Conlon PJ. 1988.** A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotech* **6**: 1204-1210.
- Hückelhoven R. 2007a.** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* **45**: 101-127.
- Hückelhoven R. 2007b.** Transport and secretion in plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 573-579.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jacobs K, 1996** Method of screening for cDNA encoding novel secreted mammalian proteins in yeast
- Jakobsen I, Rosendahl L. 1990.** Carbon Flow into Soil and External Hyphae from Roots of Mycorrhizal Cucumber Plants. *New Phytologist* **115**: 77-83.
- Jaulneau V, Cazaux M, Wong Sak Hoi J, Fournier S, Esquerré-Tugayé M-T, Jacquet C, Dumas B. 2010.** Host and nonhost resistance in *Medicago-Colletotrichum* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **23**: 1107-1117.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison Maria J. 2007.** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 1720 -1725.

7 Literaturverzeichnis

- Jin H, Pfeffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The New Phytologist* **168**: 687-696.
- Jones JDG, Dangl Jeffery L. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- de Jonge R, Peter van Esse H, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ. 2010.** Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Trigged Immunity in Plants. *Science* **329**: 953-955.
- Kale SD, Tyler BM. 2011.** Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. *Cellular Microbiology*.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, u. a. 2010.** External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142**: 284-295.
- Kamoun S, Lindqvist H, Govers F. 1997.** A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **10**: 1028-1030.
- Kamoun Sophien. 2006.** A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 41-60.
- Kamoun Sophien. 2007.** Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 358-365.
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L-J, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, u. a. 2006.** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101.
- Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie J Allan, James EK, Felle HH, Haaning LL, u. a. 2006.** A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 359-364.
- Kang S, Sweigard J A, Valent B. 1995.** The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **8**: 939-948.
- Karandashov V, Nagy R, Wegmüller S, Amrhein N, Bucher M. 2004.** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6285-6290.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002.** GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-195.
- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011.** A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current Biology: CB*.
- Kornblihtt AR. 2005.** Promoter usage and alternative splicing. *Current Opinion in Cell Biology* **17**: 262-268.
- Koske, R. E. (1981).** Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **76**, 328–330.
- Krajinski, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P. 2002.** Mth1, a Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene from *Medicago truncatula*, Shows Arbuscule-Specific Induced Expression in Mycorrhizal Tissue. *Plant biology* **4**: 754-761.
- Kuhn H, Küster H, Requena N. 2010.** Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist* **185**: 716-733.
- Lee S-J, Kelley BS, Damasceno CMB, St John B, Kim B-S, Kim B-D, Rose JKC. 2006.** A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **19**: 1368-1377.
- Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc Gérard, Journet E-P, Ané J-M, Lauber E, Bisseling T, u. a. 2004.** A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* **303**: 1361 -1364.

- Li L, Howe GA. 2001.** Alternative splicing of prosystemin pre-mRNA produces two isoforms that are active as signals in the wound response pathway. *Plant Molecular Biology* **46**: 409-419.
- Link TI, Voegelé RT. 2008.** Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Molecular Plant Pathology* **9**: 59-66.
- Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison Maria J. 2003.** Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell* **15**: 2106-2123.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison Maria J. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **50**: 529-544.
- Lohse S, Schliemann W, Ammer C, Kopka J, Strack D, Fester T. 2005.** Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **139**: 329-340.
- van Loon LC, Rep M., Pieterse C.M.J. 2006.** Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007.** RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 479-490.
- Mackey D, McFall AJ. 2006.** MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* **61**: 1365-1371.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, u. a. 2011.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58-63.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre G R, Harrison M J. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **14**: 1140-1148.
- Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H, Paszkowski U. 2010.** Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **22**: 3177-3187.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, u. a. 2008.** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martin Francis, Kohler Annegret, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, u. a. 2010.** Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033-1038.
- Ma W, Guttman DS. 2008.** Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 412-419.
- Mayeda A, Badolato J, Kobayashi R, Zhang MQ, Gardiner EM, Krainer AR. 1999.** Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO J* **18**: 4560-4570.
- Mersereau M, Pazour GJ, Das A. 1990.** Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* **90**: 149-151.
- Messinese E, Mun J-H, Yeun LH, Jayaraman D, Rougé P, Barre A, Loughon G, Schornack S, Bono J-J, Cook DR, u. a. 2007.** A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **20**: 912-921.
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW. 2003.** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 809-834.
- Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U, Staskawicz B J. 2000.** Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13324-13329.

7 Literaturverzeichnis

Nair MG, Safir Gene R., Siqueira JO. 1991. Isolation and Identification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza-Stimulatory Compounds from Clover (*Trifolium repens*) Roots. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 434-439.

Nemec S. 1981. Histochemical characteristics of *Glomus etunicatus* infection of Citrus limon fibrous roots. *Canadian Journal of Botany* **59**: 609-617.

Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P. 2010. HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* **22**: 3130-3141.

Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249-266.

Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt TO, Chaparro-Garcia A, Segretin ME, Stam R, Schornack S, Cano LM, u. a. 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology* **12**: 705-715.

Op den Camp R, Streng A, De Mita S, Cao Q, Polone E, Liu W, Ammiraju JSS, Kudrna D, Wing R, Untergasser A, u. a. 2011. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science (New York, N.Y.)* **331**: 909-912.

Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/... [J Exp Bot. 2009]

Pattern-recognition receptors in plant inn... [Curr Opin Immunol. 2008] -

Penmetsa RV, Cook DR. 1997. A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* **275**: 527 -530.

Peretto R, Bonfante Paola, Bettini V, Favaron F, Alghisi P. 1995. Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. *Mycorrhiza* **5**: 157-163.

Pérez Cañadillas JM, Varani G. 2003. Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *The EMBO Journal* **22**: 2821-2830.

Pieterse Corne M J, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308-316.

Pirozynski KA, Malloch DW. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Bio Systems* **6**: 153-164.

Qi M, Yang Y. 2002. Quantification of *Magnaporthe grisea* During Infection of Rice Plants Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Northern Blot/Phosphoimaging Analyses </title> *Phytopathology* **92**: 870-876.

Qi X, Bakht S, Qin B, Leggett M, Hemmings A, Mellon F, Eagles J, Werck-Reichhart D, Schaller H, Lesot A, u. a. 2006. A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18848-18853.

Ramonell KM, Zhang B, Ewing RM, Chen Y, Xu D, Stacey G, Somerville S. 2002. Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **3**: 301-311.

Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.

Regulation of ethylene-induced transcript... [Plant Cell Physiol. 2000] -

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11841 -11843.

Requena N, Breuninger M, Franken Philipp, Ocón A. 2003. Symbiotic Status, Phosphate, and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H⁺-ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* **132**: 1540 -1549.

Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JDG, Brown JKM. 2006. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *The Plant Cell* **18**: 2402-2414.

- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, Martin GB. 2007.** A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**: 370-374.
- Rossard S, Roblin G, Atanassova R. 2010.** Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1807-1816.
- Safir G R, Boyer JS, Gerdemann JW. 1971.** Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science (New York, N.Y.)* **172**: 581-583.
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G, Gerard. 1995.** Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after [gamma]-ray mutagenesis. *Plant Science* **111**: 63-71.
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, u. a. 2007.** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell* **19**: 610-624.
- Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller Thomas. 2000.** Differential Expression of Eight Chitinase Genes in *Medicago truncatula* Roots During Mycorrhiza Formation, Nodulation, and Pathogen Infection </title> *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 763-777.
- Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.; 2001** Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor; NY
- Schulze-Lefert P, Panstruga R. 2003.** Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 641-667.
- Schübler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Schütze K, Harter K, Chaban C. 2009.** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to study protein-protein interactions in living plant cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **479**: 189-202.
- Sesma A, Osbourn AE. 2004.** The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* **431**: 582-586.
- Showalter AM, Bell JN, Cramer CL, Bailey J A, Varner JE, Lamb CJ. 1985.** Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 6551-6555.
- Sickmier EA, Frato KE, Shen H, Paranawithana SR, Green MR, Kielkopf CL. 2006.** Structural basis for polypyrimidine tract recognition by the essential pre-mRNA splicing factor U2AF65. *Molecular Cell* **23**: 49-59.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Skibbe DS, Doehlemann G, Fernandes J, Walbot V. 2010.** Maize Tumors Caused by *Ustilago maydis* Require Organ-Specific Genes in Host and Pathogen. *Science* **328**: 89 -92.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I, Cornelis GR. 1995.** Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11998-12002.
- Spanu P, Boller Thomas, Ludwig A, Wiemken A, Faccio A, Bonfante-Fasolo P. 1989.** Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* **177**: 447-455.
- Stavrinos J, Ma W, Guttman DS. 2006.** Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathogens* **2**: e104.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM. 2009.** Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 233-263.

7 Literaturverzeichnis

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, u. a. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959-962.

Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants.

Stringer MA, Dean R A, Sewall TC, Timberlake WE. 1991b. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes & Development* **5**: 1161 -1171.

Sutton JM, Lea EJ, Downie J A. 1994. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* forms ion channels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 9990-9994.

Takemoto D, Jones DA. 2005. Membrane release and destabilization of *Arabidopsis* RIN4 following cleavage by *Pseudomonas syringae* AvrRpt2. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **18**: 1258-1268.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. 2003a. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**: 317-330.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F. 2003b. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **15**: 317-330.

Tepfer, D., 1989. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: A Source of Genes Having Applications in Rhizosphere Biology and Plant Development, Ecology and Evolution. In: *Plant Microbe*

The ethylene-responsive factor like protein 1... [Plant Mol Biol. 2004] - PubMed - NCBI.

The zig-zag-zig in oomycete-plant interacti... [Mol Plant Pathol. 2009] - PubMed - NCBI.

Thuring RW, Sanders JP, Borst P. 1975. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Analytical Biochemistry* **66**: 213-220.

Torregrosa C, Cluzet S, Fournier J, Huguet T, Gamas P, Prospéri J-M, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B, Jacquet C. 2004. Cytological, genetic, and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* **17**: 909-920.

Torres MA, Dangl Jeffery L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397-403.

Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latché A, Pech J-C, Bouzayen M. 2003. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Letters* **550**: 149-154.

Trouvelot A. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes de détermination ayant une signification fonctionnelle.

Truernit E, Haseloff J. 2008. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods* **4**: 15.

Truman W, de Zabala MT, Grant M. 2006. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **46**: 14-33.

Unique mode of GCC box recognition by the DNA-bi... [J Biol Chem. 1998] –

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Yves. 1998. Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 5004-5007.

Danke...

... Prof. Dr. Natalia Requena für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen, die tolle Betreuung, die langen Nächte im kleinen und nicht so kleinen Büro sowie die geteilte Begeisterung für potentielle Repeatspleißstellen .

... Prof. Dr. Peter Nick für die Übernahme des Koreferates

... der Mykorrhizagruppe und dem Kompetenzlabor für die wunderbare, schokoladenreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit.

... ganz besonders dir, Hannah, für die Beantwortung unzähliger Fragen und die unglaubliche Hilfe gegen Ende dieser Arbeit....und weil neben deinem mein Schreibtisch gar nicht so schlimm aussah.

... den Kämpis und Fischers für die überaus nette Zusammenarbeit.

...meinem Opa Karl, der mich finanziell während des Studiums unterstützte und sich sicherlich am meisten über diesen Satz freut.

...an alle meine Freunde die mich noch mögen, obwohl ich viel zu wenig Zeit für sie hatte.

... im Besonderen meinen Eltern ohne deren Unterstützung mir das Studium unmöglich gewesen wäre.



Lebenslauf

Silke Kloppholz – Dipl.-Biol.

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Alter: 27 (22.05.1983)
Geburtsort: Speyer

BILDUNGSGANG

08/1993 – 03/2002

Schule

Goethe Gymnasium Germersheim,
Allgemeine Hochschulreife, Note 1,7

10/2002 – 02/2008

Studium

Universität Karlsruhe (TH)
Studiengang Biologie, Diplom
Hauptfach: Molekularbiologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Zoologie

Diplomarbeit
Institut für Angewandte Biowissenschaften
Angewandte Mikrobiologie
Thema: Sekretierte Proteine in der arbuskulären Mykorrhiza Symbiose
Abschluss als Diplom Biologin, Note : 1,7

Seit 02/2008

Promotion

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Botanik
Thema: Das Effektorprotein SP7 und seine Rolle in der arbuskulären Mykorrhiza Symbiose

KONFERENZTEILNAHMEN

- 09/2007 7th VAAM Symposium „Molecular Biology of fungi“, Hamburg.
Posterpräsentation
Kloppholz, S., Requena, N. Isolation of secreted effectors from *Glomus intraradices*
- 01/2009 Colloquium „Microbial reprogramming of plant cell development“, Freising.
- 03/2009 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar (USA).
Posterpräsentation:
Kloppholz, S., Requena, N A novel family of secreted proteins in arbuscular mycorrhizal fungi
- 09/2009 22nd New Phytologist Symposium „Effectors in plant-microbe interactions“, Paris, (Frankreich).
Posterpräsentation:
Kloppholz, S., Requena, N SK7 a nuclear targeted effector of the AM fungus *G. intraradices* increases plant compatibility
- 06/2010 Colloquium „Microbial reprogramming of plant cell development“, Freising.
- 01/2011 Review Meeting „Microbial reprogramming of plant cell development“, Bonn.
- 04/2011 VAAM-Jahrestagung 2011, Karlsruhe.
Vortrag:
Kloppholz, S., Kuhn, H., Requena, N An effector protein from the symbiotic fungus *G. intraradices* suppresses plant early defense responses

PUBLIKATION

- 07/2011 **Kloppholz, S., Kuhn, H., Requena, N.** (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotroph. *Curr. Biol.*